Université de Lausanne - Faculté de Médecine
Institut de Pharmacologie (Dir. Prof. G. Peters)

L' EXCRETION RENALE DE L'ACIDE URIQUE CHEZ LE RAT

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences de
l'Université de Lausanne pour l'obtention
du grade de docteur ès sciences

par

Dominique de ROUGEMONT-WIEDMER

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546816_0079

Université de Lausanne - Faculté de Médecine
Institut de Pharmacologie (Dir. Prof. G. Peters)

L' EXCRETION RENALE DE L'ACIDE URIQUE CHEZ LE RAT

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences de
l'Université de Lausanne pour l'obtention
du grade de docteur és sciences

par

Dominique de ROUGEMONT-WIEDMER

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1975

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM. les Prof. Georges PETERS, directeur de thèse, et Louis FAUCONNET, rapporteur de la Faculté, Mme Dr. Françoise ROCH-PAMEL et M. Dr. Jean-Pierre GUIGNARD, experts

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Mme Dominique de POUGEMONT, licenciée ès sc. nat. (diplôme d'Etat)

intitulée "L'excrétion rénale de l'acide urique chez le rat"

Lausanne, le 7 mai 1975

Le doyen de la Faculté des Sciences:
Prof. Georges BRUNISHOLZ
Vice-doyen

UNIV. LEIDEN BIBL.

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier très chaleureusement monsieur le professeur G. Peters, directeur de thèse, de ses critiques, de ses nombreux conseils et de la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ce travail.

J'exprime ma vive reconnaissance à madame F. Roch-Ramel, professeur assistant, qui m'a tout enseigné de la recherche expérimentale; sa très grande disponibilité, ses connaissances et ses conseils toujours judicieux m'ont constamment aidée dans l'élaboration de ce travail.

Mes remerciements vont également à monsieur le professeur L. Fauconnet qui a bien voulu accepter d'être rapporteur de ce travail auprès de la Faculté des Sciences; ses critiques et ses conseils m'ont été très utiles lors de la rédaction de ce travail.

Je remercie également tous les collaborateurs de l'institut de Pharmacologie, notamment mademoiselle M. Henchoz de son excellente collaboration technique et monsieur le docteur B. Rossier de ses suggestions lors de la rédaction de ce manuscript.

J'exprime toute ma reconnaissance à mon mari Michel pour son appui, ses conseils et ses nombreux encouragements. Ma gratitude s'adresse également à mes parents qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail et à ma soeur Brigitte.

A B R E V I A T I O N S

µM	micromole
nM	nanomole
pM	picomole
mg%	mg pour 100 ml
nl	nanolitre
nm	nanomètre
cpm	désintégration (ou coups) par minute
C	clearance
GFR	filtration glomérulaire
TF/P	concentration tubulaire/concentration plasmatique
U/P	concentration urinaire/concentration plasmatique
PZA	acide pyrazinoïque
PAH	acide paraaminohippurique

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS

ABREVIATIONS

CHAPITRE 1 : PARTIE THEORIQUE 1

1.1. Introduction 1

1.2. Rappel anatomique et techniques utilisées en physiologie rénale 7

1.2.1. Anatomie du rein 7

1.2.2. Méthodes d'exploration 11

A.Mesure des clearances urinaires 11

B.Stop-flow 12

C.Tranches de rein in vitro 14

D.Microponction en écoulement libre 14

E.Microperfusion tubulaire in situ 15

F.Microinjection 16

G.Tubules rénaux isolés 17

1.3. Médicaments et toxiques influençant l'excrétion rénale de l'acide urique 18

1.3.1. Inhibiteurs de la réabsorption 18

1.3.2. Inhibiteurs de la sécrétion 19

1.3.3. Médicaments à "effet paradoxal" 20

1.3.4. Substances inhibant la biosynthèse ou la dégradation métabolique de l'acide urique 21

1.3.5. L'excrétion rénale de l'acide urique par le rein lésé 22

1.4. Excrétion rénale de l'acide urique dans les différentes classes et espèces animales 22

1.4.1. Introduction 22

1.4.2. Excrétion rénale de l'acide urique chez les oiseaux et les reptiles 26

1.4.3. Excrétion rénale de l'acide urique caractérisée par une sécrétion nette chez certains mammifères 28

1.4.4. Excrétion rénale de l'acide urique caractérisée par une réabsorption nette chez certains mammifères 32

1.4.5. Conclusions 36

1.5. But de nos expériences 37

CHAPITRE 2 : PARTIE TECHNIQUE 38

2.1. Conditions expérimentales 38

2.1.1. Expériences de microponction en écoulement libre 38

2.1.2. Expériences de clearance 42

2.2. Description de la technique des microponctions en écoulement libre 46

A. Préparation du rat 46

B. Prélèvement de liquide tubulaire 47

2.3. Description de la technique de clearance 51

2.3.1. Mesures de clearance chez des rats anesthésiés 51

2.3.2. Mesures de clearance chez des rats non-anesthésiés 51
2.4. Dosage de l'inuline 52
A.Principe du dosage 52
B.Solutions 53
C.Dosage dans les échantillons plasmatiques et urinaires 53
D.Dosage dans les échantillons tubulaires 54
E.Conservation de l'inuline dans les échantillons plasmatiques et urinaires 55
2.5. Dosage de l'acide urique 56
2.5.1. Dosage par la méthode enzymatique 56
A.Principe du dosage 56
B.Solutions 57
C.Dosage 57
D.Calculs 59
E.Conservation de l'acide urique dans les échantillons plasmatiques et urinaires 59
2.5.2. Dosage par la méthode fluorimétrique 60
A.Principe du dosage 60
B.Dosage dans les échantillons plasmatiques et urinaires 64
a.Solutions 64
b.Dosage 64
C.Dosage dans les échantillons tubulaires 65

a.Solutions 65

b.Dosage 65

c.Remarque 67

2.5.3. Contrôles de la validité de la méthode fluorimétrique 67

A.Absence d'interférence de composés plasmatiques ou urinaires 68

B.Absence d'interférence de composés ajoutés aux solutions de perfusion 69

C.Précision de la méthode 70

2.5.4. Comparaison des méthodes enzymatique et fluorimétrique 74

2.5.5. Déprotéinisation plasmatique 77

A.Ultrafiltration 77

B.Comparaison de la méthode d'ultrafiltration avec la méthode chimique 79

CHAPITRE 3 : RESULTATS DE MICROPONCTION EN ECOULEMENT LIBRE 83

3.1. Calculs 83

3.2. Résultats 85

3.2.1. Fonctions rénales globales 85

A.Remarques 85

B.Résultats 89

3.2.2. Résultats de microponction 91

A. Résultats dans les groupes de rats ayant des taux plasmatiques différents 91

B. Comparaison du groupe de rats au taux plasmatique physiologique d'acide urique avec le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique le plus élevé 98

C. Comparaison du groupe de rats perfusé par de l'oxonate avec le groupe de rats perfusé par de l'acide urique 100

D. Comparaison des groupes de rats ayant des taux plasmatiques d'acide urique différents 103

3.3. Discussion 106

3.3.1. Utilisation de l'oxonate 106

3.3.2. Transport bidirectionnel de l'acide urique 107

3.3.3. Comparaison de nos résultats avec ceux obtenus dans d'autres groupes de travail 112

3.3.4. Remarques 115

3.4. Conclusion 116

CHAPITRE 4 : RESULTATS DES EXPERIENCES DE CLEARANCE CHEZ DES RATS ANESTHESIES ET CHEZ DES RATS NON-

ANESTHESIES 118

4.1. Résultats 118

4.1.1. Comparaison des mesures de clearance chez des rats anesthésiés et chez des rats non-anesthésiés 118

4.1.2. Effet de l'hémolyse sur la concentration plasmatique de l'acide urique 123

4.2. Discussion 123

CHAPITRE 5 : RESUME DES RESULTATS ET CONCLUSIONS 126

BIBLIOGRAPHIE 129

CHAPITRE 1 : PARTIE THEORIQUE

1.1. INTRODUCTION

L'acide urique est le produit terminal de la dégradation des purines chez l'homme et chez les singes supérieurs (fig.1.1): c'est une trihydroxypurine (2,6,8-trihydroxypurine) peu soluble dans l'eau. Chez les mammifères uréothèles, à l'exception de l'homme et de quelques espèces de singes anthropoïdes, une partie de l'acide urique est convertie sous l'action de l'uricase en allantoïne, substance beaucoup plus hydrosoluble. Chez les oiseaux et les reptiles, l'acide urique est non seulement le produit final de dégradation des purines mais il est aussi la forme sous laquelle l'azote des protéines est excrété ("uricothélisme"). Dans les espèces animales appartenant aux classes inférieures, l'allantoïne est transformée, par l'action de l'allantoïnase, en acide allantoïque, qui est lui-même transformé en acide glycoxylique et urée, par l'action de l'allantoïcase (fig.1.2), (Harper, 1969).

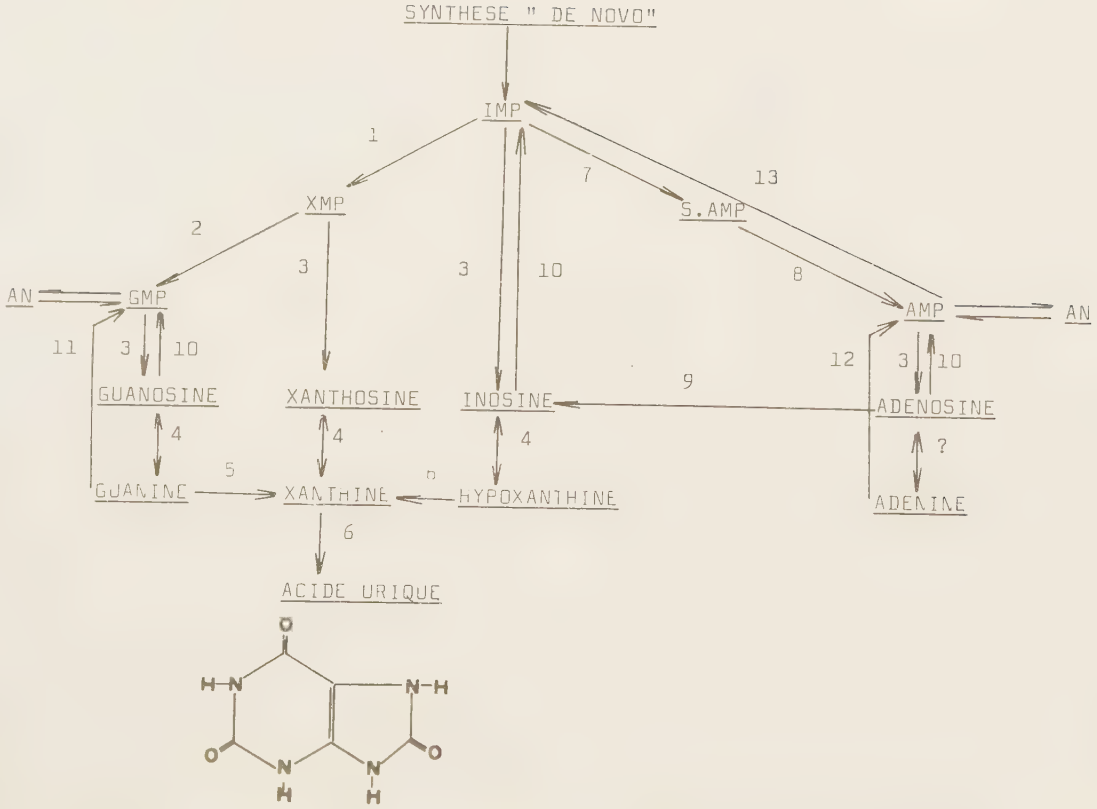


Fig.1.1 : Réactions de transformation des ribonucléotides puriques en acide urique

Figure 1.1 : (suite) (Schéma de Cartier et coll.,1973).

AN : acide nucléique

AU : acide urique

Nucléotides : IMP : acide inosinique

XMP : acide xanthylique

S.AMP : acide adénylsuccinique

GMP : acide guanylique

AMP : acide adénylique

Enzymes : 1. IMP-deshydrogénase

2. XMP-aminase

3. Phosphatase (5'-nucléotidase)

4. Nucléoside-phosphorylase

5. Guanase

6. Xanthine-oxydase

7. Adénylosuccinate synthétase

8. Adénylosuccinase

9. Adénosine-désaminase

10. Nucléoside-kinase

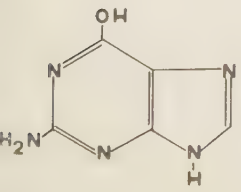
11. (Hypoxanthine-guanine)-phosphoribosyltransférase

12. (Adénine)-phosphoribosyltransférase

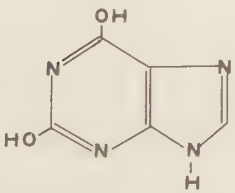
13. AMP-désaminase

Purines :

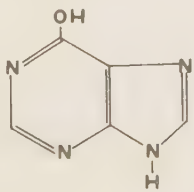
Guanine



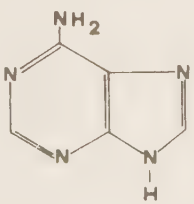
Xanthine



Hypoxanthine



Adénine



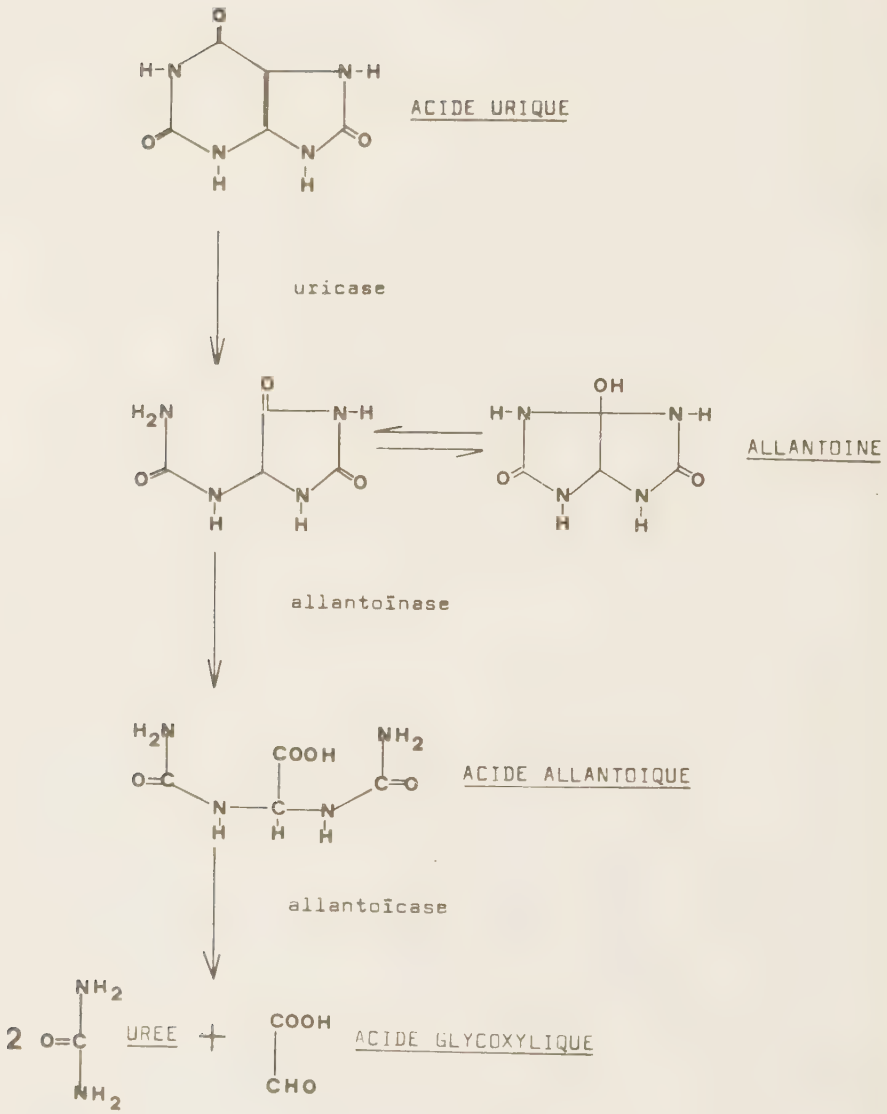


Fig.1.2 : Réactions de dégradation de l'acide urique

(Schéma tiré de Harper,1969)

Chez la plupart des animaux, la dégradation des purines passe par le stade de l'acide urique; il y a toutefois quelques exceptions : chez les sangsues et les moules d'eau douce, la dégradation des purines s'arrête au stade de l'hypoxanthine; les araignées, d'autre part, n'excrètent que de la guanine (Keilin, 1959).

Les sources des purines excrétées sous forme d'acide urique sont :

- le catabolisme des acides nucléiques ingérés;
- le métabolisme des acides nucléiques cellulaires;
- la biosynthèse des purines : une partie des nucléotides puriques nouvellement synthétisés et non encore incorporés dans des acides nucléiques sont transformés en acide urique et excrétés (Cartier et coll., 1973).

La production d'acide urique dépend directement de la quantité des purines, l'adénine et la guanine, présente dans l'organisme et accessible aux mécanismes de dégradation ("pool"). Ce pool est augmenté par une dégradation accrue des acides nucléiques; il est diminué par la resynthèse des nucléotides, l'acide adénylique (AMP) et l'acide guanylique (GMP), voie de récupération des purines (Cartier et coll., 1973).

Le foie est l'organe principal de la synthèse de l'acide urique, et chez les espèces possédant de l'uricase, de sa dégradation. Chez l'homme et chez les singes supérieurs, espèces dépourvues d'uricase, l'acide urique formé par le foie est excrété en majeure partie par les reins. L'intestin peut cependant participer (au maximum pour un tiers) à son élimination;

toutefois l'excrétion fécale est pratiquement nulle, car l'acide urique est dégradé en allantoïne, urée et ammoniaque par les microorganismes intestinaux (Cartier et coll., 1973). Chez les espèces possédant une uricase active mais incapables de dégrader l'allantoïne dans leur organisme, la voie principale de l'excrétion d'allantoïne est également urinaire. L'intestin participe à l'élimination de l'allantoïne comme à celle de l'acide urique.

Le taux plasmatique d'acide urique chez l'homme est d'environ 300 µM/l (5 mg %); ce taux est 5 à 20 fois plus élevé que celui des mammifères inférieurs possédant une activité uricasique. La concentration plasmatique de l'acide urique chez l'homme, est à la limite de la solubilité. En effet Seegmiller (1965) a montré que la solubilité de l'acide urique dans le plasma humain est de 420 µM/l (7 mg %). Le rein joue un rôle primordial dans la défense de l'uricémie normale de l'homme; toute diminution de l'excrétion rénale d'acide urique conduit à une hyperuricémie. L'hyperuricémie, à son tour, peut produire une précipitation d'acide urique dans les tissus articulaires ou périarticulaires, dans le tissu rénal ou dans l'urine du bassinet rénal pouvant se manifester cliniquement par des crises de goutte, d'arthrite goutteuse ou de lithiase rénale. Une hyperuricémie peut être non seulement d'origine rénale mais aussi métabolique, elle peut être génétique ou acquise (Rundles et coll., 1969).

L'excrétion rénale de l'acide urique est un phénomène complexe qui n'a pas encore été élucidé dans tous ses détails. L'étude comparée de l'excrétion rénale de l'acide uri-

que chez différentes espèces a permis de montrer que l'acide urique est filtré au niveau glomérulaire puis généralement réabsorbé (transport de la lumière tubulaire vers le tissu interstitiel), mais aussi et en même temps sécrété (transport des capillaires péritubulaires dans la lumière tubulaire) au niveau tubulaire. L'importance relative de ces deux processus de transport varie d'une espèce à l'autre.

Le but de notre travail a été celui d'étudier ces mouvements de transport chez le rat en utilisant la méthode de microponctions en écoulement libre, qui permet de localiser les mécanismes de transport rénal.

1.2. RAPPEL ANATOMIQUE ET TECHNIQUES UTILISEES EN PHYSIOLOGIE RENALE

Afin de permettre une compréhension plus aisée de la présentation des données sur l'excrétion rénale de l'acide urique chez les différentes espèces animales, nous rappellerons brièvement les principales données d'anatomie et les méthodes d'exploration des fonctions rénales.

1.2.1. Anatomie du rein

Le rein est un viscère double composé de plusieurs milliers à un million d'unités (1'000'000 à 1'250'000 dans chacun des deux reins de l'homme et environ 30'000 par rein

de rat), appelées néphrons. Un néphron consiste en un corpuscule de Malpighi (glomérule et capsule de Bowman), un tube proximal (partie contournée et partie rectiligne), une anse de Henle (comprenant une partie grêle descendante et ascendante et une partie large ascendante) et un tube contourné distal. Plusieurs néphrons s'abouchent à un seul tube collecteur (canal de Belini); les différents tubes collecteurs se rejoignent dans la papille pour déverser leur contenu dans le bassinet rénal (fig.1.3), (Pitts, 1970).

Le rein est divisé en une portion externe, le cortex, et une portion interne, la moëlle; cette dernière est constituée d'une zone externe ou moëlle externe et d'une zone interne ou moëlle interne. Les corpuscules de Malpighi ne se trouvent que dans le cortex (Pitts, 1970).

On distingue deux types de néphrons : les néphrons superficiels, dont les corpuscules de Malpighi sont situés dans la couche externe du cortex, leurs tubes contournés proximaux et distaux atteignent parfois la surface du rein et les anses de Henle sont courtes; les néphrons juxtamédullaires, dont les corpuscules de Malpighi sont situés dans la couche juxtamédullaire du cortex, ils sont placés en profondeur et ont des anses de Henle longues (fig.1.4), (Pitts, 1970).

Fig.1.3 : Schéma d'un néphron

a. Glomérule

b. Capsule de Bowman

c. Tubule proximal contourné

d. Tubule proximal droit

e. Anse de Henle

f. Tubule distal contourné

g. Tube collecteur

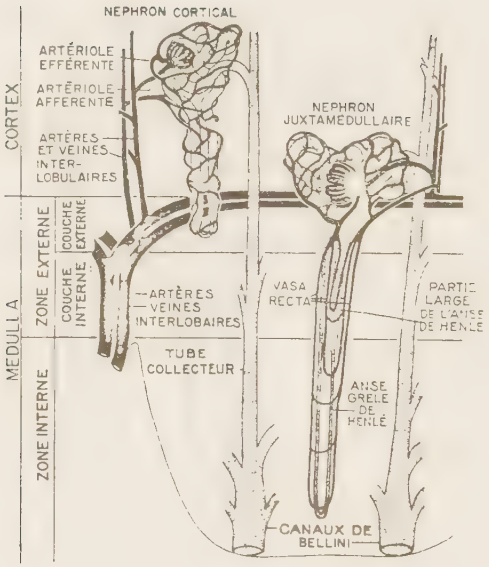


Fig.1.4 : Représentation des néphrons superficiels et juxta-médullaires

(Tiré de R.F.Pitts : Physiologie du rein et du milieu intérieur.Masson,Paris,1970)

1.2.2. Méthodes d'exploration

A. Mesure des clearances urinaires

La clearance totale d'une substance est définie par le nombre de ml d'eau plasmatique complètement épuré de cette substance en une minute et est égale au rapport : quantité de substance éliminée (par toutes les voies) par unité de temps / concentration plasmatique. La clearance urinaire d'une substance (x) est définie comme la quantité éliminée dans l'urine par unité de temps divisée par la concentration dans l'eau plasmatique, donc

$$C_{urinaire} = \frac{\text{concentration urinaire de } x \times \text{débit urinaire}}{\text{concentration plasmatique libre de } x}$$

(dans la suite de ce travail, le symbole C sera utilisé pour désigner les clearances urinaires).

Si une substance est filtrée librement à travers les capillaires glomérulaires et si elle n'est ni réabsorbée, ni sécrétée dans le système tubulaire, sa clearance urinaire mesure le taux de la filtration glomérulaire; l'inuline (un polymère naturel du fructose) paraît posséder ces propriétés et est généralement considérée comme substance de référence pour mesurer la filtration glomérulaire (Pitts, 1970).

Toute substance dont la clearance est supérieure à la filtration glomérulaire, donc à la clearance de l'inuline, est "sécrétée" ($C_{substance} / C_{inuline} > 1$) au niveau tubulaire. Toute substance dont la clearance est inférieure à la filtration glomérulaire est "réabsorbée" ($C_{substance} / C_{inuline} < 1$) de

l'urine primitive. Toute "sécrétion" ou "réabsorption" peut être due soit à un transport actif contre un gradient électrochimique (sécrétion et réabsorption véritables) ou à une diffusion dans la direction d'un gradient électrochimique ("sécrétion apparente" et "rediffusion"). Une substance peut être sécrétée et réabsorbée en même temps. Pour une telle substance, on parle de sécrétion nette lorsque le transport rénal est bidirectionnel avec prédominance du mouvement de sécrétion sur celui de réabsorption et inversement de réabsorption nette lorsque la réabsorption est prédominante.

La technique des clearances urinaires donne une mesure des fonctions rénales globales mais n'indique pas ce qui se passe au niveau tubulaire. Afin de localiser les transports tubulaires dans le néphron, d'autres méthodes sont nécessaires. Ces méthodes ne peuvent généralement pas être appliquées à l'homme pour des raisons évidentes d'éthique médicale.

B. Stop-flow

Cette technique a pour but de localiser les processus de transport. L'uretère d'un animal en état de forte diurèse osmotique est clampé pendant quelques minutes, la filtration glomérulaire est de ce fait fortement réduite; pendant cette période, des solutés sont soit sécrétés et s'ajoutent au liquide tubulaire, soit réabsorbés et quittent le liquide tubulaire. Lors du déclampage de l'uretère, l'écoulement urinaire étant très rapide, (grâce à la diurèse osmotique), peu d'échanges ont lieu entre l'urine primitive et les cellules tubulaires. Des échantillons

urinaires successifs sont récoltés à l'uretère, les premiers correspondant à des échantillons qui ont stationné dans les canaux collecteurs et les tubules distaux, les derniers à des échantillons provenant des tubules proximaux. Après déclampage de l'uretère, l'arrivée de liquide nouvellement filtré est signalé par la présence de créatinine ou d'inuline dans l'échantillon, ces substances étant perfusées vers la fin de la période de "stop-flow" (Malvin et coll., 1958). Par leur ordre d'apparition et leur composition, les échantillons indiquent à quel niveau du néphron la composition urinaire a été modifiée pendant l'arrêt de l'écoulement du liquide tubulaire. Pour déterminer le niveau tubulaire auquel un échantillon d'urine a séjourné pendant la période de "stop-flow", on mesure la concentration de sodium et de PAH (p-aminohippurate) : en effet, les échantillons contenant la plus faible concentration de sodium représentent de l'urine arrêtée au niveau des tubules distaux, où la réabsorption de sodium non suivie de réabsorption d'eau abaisse la concentration de sodium dans le liquide tubulaire. Les échantillons montrant une concentration de PAH élevée correspondent à l'urine provenant des segments proximaux, qui sécrètent le PAH; le PAH doit être administré par voie intraveineuse après l'arrêt de l'écoulement d'urine et de liquide tubulaire.

De nombreuses modifications de la méthode de "stop-flow" ont été proposées. Une de ces modifications consiste à injecter la substance marquée que l'on veut étudier dans l'artère rénale juste après le clampage de l'uretère; lors du déclampage, la collection des échantillons urinaires est la mê-

me que précédemment. Cette méthode facilite la mise en évidence d'une éventuelle sécrétion, en augmentant le gradient favorisant le passage de la substance étudiée du sang à l'urine primitive.

C. Tranches de rein in vitro.

Cette technique permet d'étudier les transports à travers les membranes limitant les cellules tubulaires, principalement les transports de substances à travers les membranes basales (Cross et coll., 1950). Pour étudier la captation de substances par les cellules tubulaires, des tranches de cortex rénal sont incubées in vitro dans un milieu de composition déterminée. Après une période d'incubation, la concentration de la substance étudiée est mesurée dans le tissu et dans le milieu d'incubation. Cette technique renseigne sur l'accumulation éventuelle d'une substance. Pour étudier l'expulsion d'une substance par les cellules tubulaires, celles-ci sont d'abord préchargées par la substance considérée. Les tranches préchargées sont ensuite incubées dans un milieu contenant la substance étudiée à une concentration moindre que celle dans les cellules.

D. Microponction en écoulement libre

Cette méthode donne des renseignements plus précis sur la localisation des transports tubulaires rénaux. Du liquide tu-

bulaire est collecté à l'aide de micropipettes en divers endroits du néphron (Windhager, 1968); le schéma et les détails de cette technique sont présentés dans le chapitre 2. Les concentrations de la substance étudiée et de l'inuline, qui est utilisée pour évaluer les mouvements d'eau, car les tubules sont imperméables à l'inuline, sont déterminées dans le liquide tubulaire collecté.

Seuls certains segments de certains néphrons sont accessibles à la microponction (voir fig.1.4). Ce sont : les convolutions proximales ou distales des néphrons superficiels situées à la surface du cortex ou bien les anses de Henle des néphrons juxtamédullaires et les tubes collecteurs, abordables chez certaines espèces à la surface de la papille.

E. Microperfusion tubulaire in situ

Cette technique permet de mesurer des transports transtubulaires en excluant les effets de la filtration glomérulaire (Richards et coll., 1937). On distingue :

a. les perfusions stationnaires : cette méthode consiste à injecter à l'intérieur du tubule de l'huile en quantité suffisante pour bloquer le flux urinaire; la colonne d'huile est ensuite partagée en deux par l'injection d'une faible quantité de liquide de composition connue. Les modifications de la composition de ce liquide permettent d'évaluer les transports de certaines substances; en outre la mesure de la distance entre les deux colonnes au cours du temps permet d'évaluer la réabsorption d'eau qui, à son tour, dans les convolutions

proximales librement perméables à l'eau est une expression de la réabsorption de sodium.

b. Les perfusions continues : cette méthode consiste à perfuser à l'aide d'une pompe (20 à 30 nl/seconde) un segment tubulaire avec des solutions de composition connue et à mesurer les flux nets de réabsorption et de sécrétion de différents solutés.

Les méthodes de microponction et de microperfusion ont l'inconvénient de n'être applicables qu'à certains segments de certains nephrons; la généralisation à l'ensemble des néphrons des résultats fournis par ces techniques peut être erronée. En effet, de Rouffignac et coll. (1967) ont mis en évidence, chez cinq espèces de rongeurs, une hétérogénéité anatomique de la population des néphrons en fonction de la position de leur glomérule dans l'épaisseur du cortex, hétérogénéité anatomique à laquelle paraissent correspondre certaines hétérogénéités fonctionnelles.

F. Microinjection

Cette technique permet d'étudier des transports tubulaires dans des segments inaccessibles à la microponction (Gottschalk et coll., 1965).Pour étudier la réabsorption d'une substance, 2 à 10 nanolitres d'une solution contenant de l'inuline et le soluté à étudier qui peuvent être marqués par deux atomes radioactifs différents, par exemple ^{14}C et ^{3}H, sont injectés, au moyen d'une micropipette, dans une convolution soit proximale, soit distale, à la superficie du rein;

l'urine est collectée à l'uretère et la récupération du soluté étudié est comparée à celle de l'inuline. Une microinjection valable est caractérisée par une récupération totale de l'inuline injectée. L'urine du rein injecté ainsi que celle du rein controlatéral est collectée pour vérifier que l'inuline injectée dans la lumière tubulaire n'entre pas dans les cellules épithéliales tubulaires. Pour étudier l'existence d'une sécrétion, de l'inuline et la substance étudiée sont injectées dans les capillaires péritubulaires. La précession de la substance étudiée dans l'urine recueillie à l'uretère sur l'inuline est un indice de sécrétion, c'est-à-dire de passage de la substance à travers les parois tubulaires.

G. Tubules rénaux isolés

Cette technique consiste à disséquer un segment tubulaire puis à le plonger dans un bain de composition connue et à le perfuser in vitro avec des solutions de composition également connue. La composition du liquide recueilli à l'autre extrémité du segment est analysée. La mesure des flux nets de sécrétion et de réabsorption peut se faire dans les conditions les plus diverses, en variant les compositions du liquide perfusé et du liquide baignant le segment tubulaire (Burg et coll., 1966).

Bien que la dissection de tubules ait été tentée chez plusieurs espèces d'animaux, seuls les tubules de lapins et de serpents se prêtent à cette technique. Tous les segments du néphron de lapin peuvent être disséqués, à l'exception des tubes collecteurs papillaires, qui se fendent facilement, et des tu-

bes contournés distaux, qui sont trop courts.

1.3. MEDICAMENTS ET TOXIQUES INFLUENCANT L'EXCRETION RENALE DE L'ACIDE URIQUE

L'utilisation de nombreuses substances inhibant soit le processus de réabsorption tubulaire, soit le processus de sécrétion tubulaire a permis une meilleure compréhension des mécanismes intervenant dans l'excrétion rénale de l'acide urique. Pour plusieurs substances, l'effet uricosurique ou anti-uricosurique dépend de la dose administrée et de l'espèce animale considérée.

1.3.1. Inhibiteurs de la réabsorption

Les médicaments uricosuriques augmentent l'excrétion urinaire de l'acide urique par inhibition de la réabsorption tubulaire rénale. Les substances possédant des propriétés uricosuriques sont des acides organiques, à l'exception de la zoxazolamine qui est une base faible et un des médicaments uricosuriques les plus puissants (Gutman, 1966). Le probénécide et la sulfinpyrazone sont également uricosuriques chez l'homme; le probénécide est un dérivé de l'acide benzoïque et fut introduit en thérapeutique à l'origine pour diminuer la sécrétion tubulaire et l'excrétion urinaire de pénicilline et maintenir de ce fait un taux sanguin élevé de pénicilline (Gutman,

1966). Cependant des doses de probénécide ou de sulfinpyrazone inférieures aux doses uricosuriques entraînent une rétention d'acide urique apparemment due à une inhibition du mécanisme de sécrétion tubulaire (Yü et coll., 1953); cet "effet paradoxal" dont nous parlerons plus loin (1.3.3.) est caractéristique d'un certain nombre de substances. Le probénécide est uricosurique chez l'homme et le singe, par contre il diminue l'excrétion d'acide urique chez le chien dalmate, le cobaye, le lapin et le poulet (Mudge et coll., 1973).

Certains agents de contraste utilisés en radiographie, tels que la diiodone, ont un effet uricosurique chez l'homme (Gutman, 1966). La benziodarone, un médicament principalement utilisé comme vasodilatateur coronarien, et un de ses dérivés, la bromiodarone, sont également uricosuriques chez l'homme et utilisés dans le traitement de la goutte (Richet et coll., 1966).

1.3.2. Inhibiteurs de la sécrétion

Les substances anti-uricosuriques diminuent l'excrétion urinaire de l'acide urique soit en accélérant la réabsorption, soit en inhibant la sécrétion tubulaire d'acide urique. L'administration de lactate, d'acide pyrazinoïque ou de pyrazinamide, après transformation en acide pyrazinoïque (Weiner et coll., 1972), entraîne une rétention d'acide urique chez l'homme (Mudge et coll,, 1973). La rétention d'acide urique provoquée par ces substances est probablement due à un bloquage spécifique de la sécrétion tubulaire. Le pyrazinamide (PZA)

est un analogue du nicotinamide et est utilisé comme tuberculostatique.

L'acide paraaminohippurique (PAH) est la substance-type transportée par le mécanisme de sécrétion des acides organiques. La diminution de l'excrétion fractionnelle de l'acide urique chez le singe, le chien et le poulet, après administration de PAH, indique que la sécrétion d'acide urique est effectuée par le système transporteur des acides organiques, qui transporte le PAH (Mudge, 1973).

1.3.3. Médicaments à "effet paradoxal"

De nombreux médicaments, à dose élevée, entraînent un effet uricosurique par inhibition de la réabsorption. Toutefois ces substances sont en même temps capables, lorsqu'elles sont administrées à doses faibles, de diminuer l'excrétion fractionnelle d'acide urique, probablement en inhibant le processus de sécrétion (Yü et coll., 1955). Cet effet paradoxal a été observé pour le salicylate, le probénécide, la phénylbutazone, l'hydrochlorothiazide, le chlorothiazide, la chlorthalidone et l'acide éthacrynique (Yü et coll., 1955; Yü et coll., 1959; Healey et coll., 1959; Demartini et coll., 1962; Bryant et coll., 1962; Burns et coll., 1958; Cannon et coll., 1965; Healey et coll., 1965; Bourke et coll., 1966; Steele et coll., 1969; Mudge et coll., 1973).

1.3.4. Substances inhibant la biosynthèse ou la dégradation métabolique de l'acide urique

Les stades ultimes du catabolisme des purines sont l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique; les deux réactions sont catalysées par la xanthine-oxydase. Un médicament utilisé en clinique pour diminuer la production d'acide urique chez les malades prédisposés à l'hyperuricémie est l'allopurinol, qui a la propriété de réduire à la fois les taux d'acide urique urinaire et sérique (Elion, 1973). L'allopurinol est un analogue de l'hypoxanthine qui a une affinité pour la xanthine-oxydase 20 fois plus grande que les substrats naturels, l'hypoxanthine et la xanthine. Outre cette propriété d'être un inhibiteur compétitif de cet enzyme, l'allopurinol est également un substrat pour la xanthine-oxydase et est converti par elle en un analogue à la xanthine, l'oxypurinol. L'oxypurinol inactive la xanthine-oxydase en se fixant sur la forme réduite de cet enzyme mais s'en détache lorsque l'enzyme est réoxydé (Elion, 1973). Comme la clearance de l'hypoxanthine et de la xanthine est analogue à la filtration glomérulaire, la substitution de ces oxypurines à une partie de l'acide urique qui devrait être excrété augmente la clearance globale des produits de dégradation des purines. En outre, la normalisation de la biosynthèse de novo des purines se trouve réalisée chez beaucoup de patients par une réutilisation partielle des oxypurines pour la synthèse des acides nucléiques (Elion, 1973).

Chez les mammifères, à l'exception de l'homme et des singes supérieurs, l'acide urique est converti en allantoïne

sous l'action de l'uricase. L'oxonate, dérivé des S-triazines diurétiques, peut être utilisé comme inhibiteur de l'uricase tissulaire : son administration entraîne une augmentation marquée des taux plasmatiques et urinaires de l'acide urique et une diminution de l'excrétion urinaire de l'allantoïne (Johnson et coll., 1968). Dans nos expériences de microponction, nous avons perfusé de l'oxonate à un groupe de rats pour augmenter leur taux plasmatique d'acide urique à des valeurs supérieures à celles obtenues par une seule perfusion d'acide urique.

1.3.5. L'excrétion rénale de l'acide urique par le rein lésé

L'insuffisance rénale urémigène (concentration sanguine de l'urée dépassant 1g/l) s'accompagne régulièrement d'hyperuricémie. L'élévation de l'uricémie dans l'insuffisance rénale provient d'une diminution de la filtration glomérulaire d'acide urique due à la réduction de la population de néphrons (Rickewaert et coll., 1973).

1.4. EXCRETION RENALE DE L'ACIDE URIQUE DANS LES DIFFERENTES CLASSES ET ESPECES ANIMALES

1.4.1. Introduction

L'excrétion rénale de l'acide urique chez les mam-

mifères est très variable d'une espèce à l'autre, elle varie également à l'intérieur d'une même espèce. A taux plasmatique physiologique, la fraction de l'acide urique filtrée qui est excrétée dans l'urine est de 7 à 13 % chez l'homme, d'environ 30 % chez le rat, de 20 % chez le chien, à l'exception du chien dalmate qui excrète jusqu'à 200 % de la quantité filtrée, et de 5 à 200 % chez les singes; les lapins excrètent de façon très variable de 20 à 95 % de l'acide urique filtré et le cobaye de 200 à 400 % (Mudge et coll., 1973).

Contrairement au rein de mammifères, le rein des oiseaux et des reptiles sécrète l'acide urique, le processus de réabsorption étant pratiquement inexistant, en effet ce dernier est difficile à mettre en évidence après inhibition de la sécrétion (Mudge et coll., 1973).

La fraction excrétée de l'acide urique filtré est inférieure à 1 chez l'homme (Curate/Cinuline <1). Ce fait indique une réabsorption nette d'acide urique. Toutefois en 1957, Gutman et Yü ont proposé qu'une sécrétion d'acide urique masquée par le mécanisme de réabsorption pouvait avoir lieu dans le rein humain. Cette hypothèse est fondée sur les observations suivantes :

1. Certains agents pharmacologiques (salicylate, phénylbutazone, probénécide) sont uricosuriques lorsqu'ils sont administrés à dose élevée, mais ont un effet contraire ("paradoxal") à dose faible, puisqu'ils conduisent à une rétention d'acide urique (Yü et coll., 1955).
2. Le pyrazinamide (PZA) diminue l'excrétion rénale de l'acide

urique (Yü et coll., 1957).

3. Une sécrétion nette d'acide urique (Curate/Cinuline ≥ 1) a été observée chez certains malades hyperuricémiques.

Yü et Gutman (1961) ont fait l'hypothèse suivante : dans le rein de mammifères, la quantité d'acide urique excrétée dépend toujours de trois processus distincts : la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire; l'importance relative des mécanismes de réabsorption et de sécrétion dépend de l'espèce animale considérée et des conditions expérimentales.

La compréhension des mécanismes rénaux de l'excrétion d'acide urique exige la connaissance du taux de liaison de l'acide urique aux protéines plasmatiques; en effet la liaison d'une substance aux protéines plasmatiques empêche son élimination par filtration glomérulaire mais permet encore son passage du plasma vers l'urine primitive par sécrétion tubulaire. La liaison aux protéines peut être évaluée par des techniques in vitro telles que l'ultrafiltration, l'équilibre de dialyse et la filtration sur gel, cependant ces procédés ne donnent pas fatalement le même résultat : ainsi certains travaux indiquent une liaison importante de l'acide urique aux protéines plasmatiques chez l'homme (Adlersberg et coll., 1942; Wolfson et coll., 1947; Bene et coll., 1951; Alvsaker, 1965; Bluestone et coll., 1970; Simkin, 1972; Klinenberg et coll., 1973; Campion et coll., 1973), d'autres par contre montrent une liaison négligeable (Yü et coll., 1953; Sheikh et coll., 1968; Farrel et coll., 1971; Farrel, 1974). La même contro-

verse existe pour le plasma de chien, de cobaye, de lapin, de singe et de rat (Mudge et coll., 1968a ; Mudge et coll., 1968b; Beechwood et coll., 1964; Møller, 1965; Møller, 1966; Sheikh et coll., 1968; Fanelli et coll, 1970; Simkin, 1972; Greger et coll., 1974). Cependant, pour savoir ce qui est filtré au niveau glomérulaire, le seul procédé susceptible de donner des renseignements précis est la ponction de la capsule de Bowman; les travaux de microponction de Bordley et coll.(1933) montrent chez le serpent et la grenouille que la concentration d'acide urique dans le filtrat glomérulaire est presque identique à celle dans le plasma. Une étude récente chez le rat (Roch-Ramel et coll., en préparation) montre que le 90 % de l'acide urique contenu dans le plasma est ultrafiltré, le 10 % non-ultrafiltré serait probablement lié aux protéines plasmatiques.

Nous présenterons ici les données essentielles concernant l'excrétion rénale de l'acide urique dans les différentes classes et espèce animales. Nous considérerons trois groupes, se distinguant par l'importance relative des mouvements de sécrétion et de réabsorption :

1. Les oiseaux et les reptiles, caractérisés par une sécrétion nette d'acide urique et une réabsorption probablement négligeable.
2. Quelques mammifères caractérisés par une sécrétion nette : le chien dalmate, le cobaye, le singe macaque et le lapin.
3. La majorité des mammifères caractérisés par une réabsorption nette : l'homme, le singe, le chien et le rat.

1.4.2. Excrétion rénale de l'acide urique chez les oiseaux et les reptiles

Dans ces classes, l'acide urique est non seulement le produit de dégradation des purines, mais aussi le principal produit azoté du métabolisme des protéines; du fait de l'absence d'uricase et de la synthèse d'acide urique à partir d'ammoniaque et d'urée, le taux plasmatique est élevé et de grandes quantités d'acide urique sont éliminées. Le mécanisme de l'excrétion rénale est une sécrétion tubulaire. Ces deux classes d'animaux ont une filtration glomérulaire très basse; ils ont développé des systèmes tubulaires sécrétoires pour éliminer efficacement les déchets azotés et ils font aboutir leur métabolisme azoté à l'acide urique, produit terminal relativement insoluble qui peut être excrété comme une suspension de cristaux peut-être précipités à partir d'une solution sursaturée. Bien que l'urine des oiseaux soit une suspension de cristaux d'acide urique, il n'y a apparemment point de lithiase urique chez ces animaux. Les oiseaux et les reptiles excrètent ainsi leurs déchets azotés en perdant des quantités d'eau minimales (Pitts, 1970).

La sécrétion tubulaire a été mise en évidence par des études de clearance : chez le poulet, à taux plasmatique normal (environ 360 µM/l), le rapport de la clearance de l'acide urique à celle de l'inuline varie de 8 à 16, indice d'une sécrétion nette (Curate/Cinuline$>$1) (Shannon, 1938; Berger et coll., 1960); chez le serpent, Dantzler (1968) a obtenu également un rapport de clearances supérieur à 1 (8 à 10). Le fait

que les tranches rénales de poulet (Platts et coll., 1961) et de serpent (Dantzler, 1969; Dantzler, 1970) accumulent l'acide urique à une concentration supérieure à celle du milieu de suspension démontre la présence d'un mécanisme de transport de l'acide urique vers l'intérieur des cellules tubulaires. Des expériences de stop-flow ont montré que le transport sécrétoire était situé dans le tubule proximal du serpent (Dantzler et coll., 1967); les travaux de Dantzler (1973) sur le tubule isolé de serpent indiquent également que l'acide urique est sécrété par le tubule proximal.

Chez le poulet, l'acide urique paraît être transporté dans le sens sécrétoire par le mécanisme qui transporte aussi le PAH. En effet, le PAH entre en compétition avec l'acide urique, puisque la clearance de l'acide urique peut être diminuée par l'administration de PAH (Berger et coll., 1960); l'accumulation d'acide urique par les tranches de cortex est diminuée en présence de PAH (Platts et coll., 1961). De nombreuses autres substances inhibent aussi l'excrétion de l'acide urique par le rein de poulet; nous ne citerons que le PZA (Nechay et coll., 1960) et le probénécide;comme chez les mammifères, le probénécide inhibe l'excrétion du PAH chez cette espèce (Nechay et coll., 1959; Berger et coll., 1960). Ainsi probénécide, PAH et acide urique ont une affinité pour un même système de transport.

Chez le serpent, en revanche, le PAH n'inhibe pas la sécrétion de l'acide urique; en effet, Dantzler n'a pas observé de diminution de la clearance de l'acide urique sous adminis-

tration de PAH, ni d'inhibition par le PAH de l'accumulation d'acide urique par les tranches rénales (1970). Le mécanisme de sécrétion de l'acide urique paraît distinct de celui du PAH chez le serpent. L'existence de deux mécanismes de sécrétion distincts a été confirmée par l'étude du tubule isolé (Dantzler, 1974). Aucune étude n'a été faite sur l'influence du PZA sur l'excrétion rénale de l'acide urique chez le serpent. Le probénécide diminue la sécrétion d'acide urique et de PAH et diminue l'accumulation d'acide urique et de PAH dans les tranches rénales (Dantzler, 1970).

Chez le poulet et le serpent, le probénécide paraît être transporté par le même mécanisme que l'acide urique et inhiber ce système transporteur. Le PAH est également un inhibiteur compétitif du transport de l'acide urique chez le poulet et par conséquent transporté par le même mécanisme. En revanche il est transporté par un mécanisme différent chez le serpent, ce mécanisme étant toutefois sensible au probénécide comme le mécanisme de transport de l'acide urique.

1.4.3. Excrétion rénale de l'acide urique caractérisée par une sécrétion nette chez certains mammifères

Le chien dalmate, le cobaye et le singe macaque habituellement excrètent l'acide urique par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire nette (Curate/Cinuline$>$1); toutefois, contrairement aux observations faites chez les oiseaux et chez les reptiles, un rapport des clearances de l'acide urique à l'inuline inférieur à l'unité peut être obtenu

en présence d'inhibiteurs de la sécrétion d'acide urique (Mudge, 1973).

Le chien dalmate excrète beaucoup plus d'acide urique que les autres chiens, l'excès d'acide urique dans les urines n'étant dû ni à un métabolisme accéléré des purines, ni à une concentration plasmatique plus élevée (Friedman et coll., 1948b). Chez ce chien, la conversion de l'acide urique en allantoïne est empêchée, non par l'absence d'activité uricasique comme chez l'homme et certains singes, mais par un défaut génétique du système d'entrée par transport facilité de l'acide urique dans les cellules contenant l'uricase (Yü et coll., 1971); on observe également chez ce chien un défaut du système de transport facilité dans les érythrocytes et dans la bordure luminale des tubules rénaux (Yü et coll., 1971). La réponse uricolytique du chien dalmate reflète un trouble dans la fonction hépatique et non dans la fonction rénale; en effet après transplantation des reins de chiens dalmates dans des chiens non-dalmates, et vice-versa, les modèles caractéristiques de l'excrétion urinaire d'allantoïne et d'acide urique des receveurs, sont inchangés; par contre la transplantation réciproque du foie convertit le modèle d'excrétion rénale du receveur en celui du donneur (Gutman et coll., 1972). A taux plasmatique normal (35 à 50 µM/l), le rapport clearance urate/clearance inuline varie de 0,6 à 2,3 chez le chien dalmate (Friedman et coll., 1948b; Wolfson et coll., 1950; Yü et coll., 1960). Comme chez le poulet et le serpent, l'administration de probénécide réduit l'excrétion d'acide urique par inhi-

bition de la sécrétion tubulaire (Berger et coll., 1970; Yü et coll., 1960; Kessler et coll., 1959). L'administration de fortes doses de PAH diminue également la sécrétion d'acide urique (Yü et coll., 1960). Un transport d'acide urique dans le sens de la réabsorption peut être mis en évidence lorsque la sécrétion est inhibée; en effet, le rapport Curate/Cinuline décroît de 1,4 à 0,9 après administration de PZA (Yü et coll., 1961).

Chez le cobaye, à taux plasmatique physiologique, (40 µM/l), le rapport de la clearance de l'acide urique à celle de l'inuline varie de 2,3 à 4,1 (Curate/Cinuline$>$1), indice d'une sécrétion nette d'acide urique (Mudge et coll., 1968b); des études de stop-flow ont montré que comme chez le poulet et le serpent, la sécrétion a lieu dans le tubule proximal. La sécrétion tubulaire est inhibée par le probénécide et le PZA (Mudge et coll., 1968b); l'effet du PAH n'a pas été étudié. Comme dans le cas du chien dalmate, à côté d'une sécrétion nette observée, un mécanisme de réabsorption peut être mis en évidence lorsque la sécrétion est inhibée, par un rapport des clearances de l'acide urique et de l'inuline inférieur à 1 (Mudge et coll., 1968a).

Chez certaines espèces de singes, le macaque notamment, dont l'uricémie (plasma) est d'environ 25 µM/l, les tubules sécrètent l'acide urique à une vitesse supérieure à celle de la réabsorption, le rapport des clearances de l'acide urique et de l'inuline étant d'environ 2,5 (Fanelli et coll., 1971).

Chez le lapin, à taux plasmatique normal d'acide urique (10 à 30 µM/l), le rapport de la clearance de l'acide urique à celle de l'inuline est généralement inférieur à 1, néanmoins chez 20 % des animaux il est supérieur à 1 (Beechwood et coll., 1964). Une augmentation de la concentration plasmatique d'acide urique (Poulsen, 1955; Møller, 1965a) ou une diurèse au mannitol (Møller, 1962; Møller, 1966) induisent parfois une sécrétion nette, si celle-ci n'est pas observée à taux normal. La réabsorption nette d'acide urique a été mise en évidence par des études de clearance, le rapport Curate/Cinuline variant de 0,2 à 0,9 (Poulsen, 1954; Møller, 1962; Beechwood et coll., 1964); le site de réabsorption a été localisé par stop-flow dans le tubule proximal comme le site de sécrétion (Beechwood et coll., 1964; Møller, 1965b). Les études de stop-flow ont montré que comme chez le chien dalmate et le cobaye, le probénécide inhibe la sécrétion (Beechwood et coll., 1964; Møller, 1965b). Il a été montré par les méthodes de stop-flow et des tranches de cortex rénal que le PAH inhibe aussi l'accumulation cellulaire et la sécrétion d'acide urique (Despopoulos, 1959; Platts et coll., 1961; Møller, 1967; Sheikh et coll., 1971; Berndt, 1965). En revanche, le PZA n'inhibe pas le transport sécrétoire d'acide urique chez le lapin mais aurait un effet inhibiteur sur la réabsorption ou même, selon Beechwood et coll., (1964), un effet activateur sur la sécrétion.

Cet effet du PZA différent de celui que l'on constate chez les autres espèces animales met en évidence la complexité de l'action des inhibiteurs des transports d'acide urique qui, suivant l'espèce animale, ont un effet prédominant

soit sur le mécanisme de sécrétion, soit sur le mécanisme de réabsorption.

1.4.4 Excrétion rénale de l'acide urique caractérisée par une réabsorption nette chez certains mammifères

L'excrétion rénale de l'acide urique est caractérisée chez l'homme, le singe, le chien et le rat par un mécanisme de réabsorption prédominant.

Chez l'homme, à taux plasmatique normal d'acide urique (environ 300 µM/l), l'excrétion fractionnelle d'acide urique est extrêmement faible, le rapport des clearances de l'acide urique et de l'inuline étant d'environ 0,05 (Coombs et coll., 1940; Berliner et coll., 1950; Gutman et coll., 1957; Seegmiller et coll., 1962). La réabsorption d'acide urique est inhibée par le probénécide; alors que chez les espèces caractérisées par une sécrétion nette d'acide urique, le probénécide est anti-uricosurique, chez l'homme il est uricosurique. Le PZA est un inhibiteur de la sécrétion et a été utilisé dans le but d'évaluer l'intensité du mouvement sécrétoire, seule approche possible chez l'homme, les techniques de microponction ne pouvant être envisagées pour des raisons éthiques. (Steele et coll., 1967; Steele et coll., 1969; Gutman et coll., 1969). Le PAH par contre est inefficace (Gutman, 1972).

Le chimpanzé a un taux plasmatique d'acide urique comparable à celui de l'homme (150 à 300 µM/l), son foie est également dépourvu d'uricase; des études de clearance ont mis en évidence une réabsorption nette d'acide urique qui peut être

inhibée par le probénécide et les agents uricosuriques utilisée chez l'homme (Fanelli et coll., 1971; Fanelli et coll., 1972; Fanelli et coll., 1973a). Le PZA, chez le chimpanzé, a un "effet paradoxal"; en effet, le PZA inhibe l'excrétion d'acide urique lorsque sa concentration plasmatique est basse, mais lorsque celle-ci est plus élevée, il augmente la clearance de l'acide urique. Fanelli et coll., (1973b) expliquent cet "effet paradoxal" du PZA par le fait que les flux transtubulaires bidirectionnels de l'acide urique sont tous deux sensibles au PZA. Toutefois l'effet inhibiteur sur le mouvement de sécrétion est maximal lorsque la concentration plasmatique du PZA est de 10 µg/ml, tandis que l'effet inhibiteur sur la réabsorption apparaît seulement à la concentration de 200 µg/ml. Ces expériences reprennent l'hypothèse de Yü et Gutman (1961) quant à l'explication de l'"effet paradoxal" des médicaments uricosuriques chez l'homme. Le PZA lui-même est sujet à un transport bidirectionnel; en effet chez le chimpanzé, la clearance du PZA est supérieure à la filtration glomérulaire, indice d'une sécrétion nette, mais, après inhibition de la sécrétion par le PAH, la clearance du PZA est inférieure à la filtration glomérulaire, indiquant une réabsorption nette. Chez le chimpanzé, de fortes doses de PAH inhibent la sécrétion d'acide urique, alors que le PAH est inefficace chez l'homme (Fanelli et coll., 1973b).

Le singe Cebus a été utilisé comme modèle expérimental du rein humain, son excrétion fractionnelle d'acide urique étant également très faible (5 à 10 % : Skeith et coll., 1968; Fanelli et coll., 1970a; Fanelli et coll., 1970c; May et coll., 1971); en outre sa réponse aux différents agents uricosuriques et anti-

uricosuriques est semblable à celle de l'homme (Skeith et coll., 1968; Fanelli et coll., 1970a; Fanelli et coll., 1970c; Blanchard et coll., 1972; Vinay et coll., 1972; Lemieux et coll., 1973; Fanelli et coll., 1974). Des expériences de microponction (Roch-Ramel et coll., 1973b) ont montré qu'il y a réabsorption d'acide urique au niveau du tubule proximal; cette réabsorption est inhibée partiellement par un dérivé du probénécide, le 2- nitroprobénécide.Le mécanisme de sécrétion a été mis en évidence après augmentation de l'excrétion fractionnelle soit par administration d'un agent uricosurique, soit par une surcharge d'acide urique. Dans ces conditions l'administration de PZA ou de fortes doses de PAH diminue l'excrétion fractionnelle d'acide urique (Fanelli et coll., 1970a; Skeith et coll., 1968; Weiner et coll., 1972).

Le chien a un taux plasmatique d'acide urique d'environ 25 µM/l et excrète habituellement 20 % de la fraction d'acide urique filtrée (Friedman et coll., 1948b; Kessler et coll., 1959; Yü et coll., 1960; Lathem et coll., 1960; Yü et coll., 1961; Mudge et coll., 1966a; Berger et coll., 1970; Yü et coll., 1971), il y a donc une réabsorption nette d'acide urique. Le site de réabsorption d'acide urique a été localisé par la méthode de stop-flow dans le tubule proximal (Kessler et coll., 1959; Yü et coll., 1960; Yü et coll., 1961; Mudge et coll., 1968; Lathem et coll., 1960; Davis et coll., 1965). Le probénécide, généralement uricosurique chez les autres espèces animales, a un effet très peu marqué sur la clearance de l'acide urique chez le chien (Kessler et coll., 1959; Yü et coll., 1960),

Une excrétion fractionnelle d'acide urique supérieure à 1 n'a pas été démontrée de façon certaine (Lathem et coll., 1960; Yü et coll., 1960; Mudge et coll., 1968). Cependant les résultats d'expériences basées sur une méthode de stop-flow modifiée permettant la mise en évidence d'une sécrétion, peuvent être considérés comme un argument en faveur d'une sécrétion d'acide urique dans le tubule proximal (Zins et coll., 1968; Davis et coll., 1965); celle-ci peut être inhibée par l'administration de PAH et de PZA, bien que ces deux substances n'aient pas d'effet net sur l'excrétion fractionnelle. En résumé, chez le chien, le processus de réabsorption est plus important que celui de sécrétion, dont l'existence ne peut être démontrée que par des techniques particulières permettant d'observer un mouvement unidirectionnel même faible. Il paraît d'autre part, comme le rat, être très peu sensible aux agents inhibiteurs des transports d'acide urique.

Le rat a un taux plasmatique d'acide urique d'environ 40 µM/l et le rapport de la clearance de l'acide urique à celle de l'inuline varie de 20 à 30 % (Friedman et coll., 1948a; Boudry, 1971a; Steele et coll., 1974), indice d'une réabsorption nette d'acide urique. La réabsorption a été localisée, comme chez les autres espèces, essentiellement dans le tubule proximal par des expériences de microinjection (Kramp et coll., 1971), de microperfusion (Sonnenberg et coll., 1965; Boudry et coll., 1970; Roch-Ramel et coll., en préparation) et de microponction (Roch-Ramel et coll., en préparation). Malgré une réabsorption d'acide urique prédominante, des expériences de microperfusion tubulaire, qui permettent d'observer les flux nets, indiquent un transport

dans le sens de la sécrétion dans le tubule proximal (Boudry et coll., 1970; Roch-Ramel et coll., en préparation); d'autres travaux de microponction et de microperfusion (Greger et coll., 1971; Lang et coll., 1972; Lang et coll., 1973; Greger et coll., 1974) sont en contradiction et indiquent une sécrétion nette dans le tubule proximal à taux plasmatique physiologique et une réabsorption importante dans l'anse de Henle. La discussion de ces résultats sera reprise lors de la discussion de nos résultats (chapitre 3). L'excrétion rénale de l'acide urique chez le rat est très peu sensible aux agents inhibiteurs des transports. En effet, le probénécide a un effet uricosurique, par inhibition de la réabsorption, uniquement au taux plasmatique physiologique d'acide urique. Cet effet diminue avec l'augmentation du taux plasmatique d'acide urique. Le PAH et le PZA, inhibiteurs de la sécrétion d'acide urique, ne diminuent l'excrétion fractionnelle de l'acide urique de manière significative que lorsque le taux plasmatique d'acide urique est élevé (Boudry, 1971b).

1.4.5 Conclusions

L'excrétion rénale de l'acide urique se fait par filtration glomérulaire, par réabsorption tubulaire et par sécrétion tubulaire, l'importance relative des mécanismes de réabsorption et de sécrétion variant considérablement d'une espèce animale à l'autre.

Les agents inhibiteurs du transport rénal de l'acide urique agissent vraisemblablement sur les processus de réabsor-

ption et de sécrétion simultanément, comme cela a été clairement démontré chez le chimpanzé (Fanelli et coll., 1973b). La prédominance de l'effet uricosurique ou anti-uricosurique dépend de la dose de substance administrée et de l'espèce animale considérée.

1.5. BUT DE NOS EXPERIENCES

Notre travail a eu pour objectif de détecter chez le rat un mécanisme de sécrétion, qui au taux plasmatique normal d'acide urique est masqué par la réabsorption. Nous avons utilisé la méthode des microponctions en écoulement libre pour suivre la réponse des différents segments des néphrons superficiels, seuls accessibles par cette méthode, à une augmentation du taux plasmatique d'acide urique, Boudry (1971a) ayant observé que le rapport des clearances de l'acide urique et de l'inuline augmentait avec le taux plasmatique.

Au cours de nos expériences de microponction chez le rat anesthésié au pentobarbital sodique, nous avons observé que les concentrations plasmatiques d'acide urique mesurées étaient plus basses et l'excrétion fractionnelle d'acide urique plus élevée que ce qui avait été observé par Boudry (1971a) chez le rat non-anesthésié . Dans la seconde partie de notre travail, nous étudions les raisons de cette divergence.

CHAPITRE 2 : PARTIE TECHNIQUE

2.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

2...1. Expériences de microponction en écoulement libre

Les expériences de microponction tubulaire en écoulement libre ont été faites pour connaître les variations des transports bidirectionnels de l'acide urique à travers les tubules proximaux et distaux superficiels, en fonction de la concentration sanguine dont les modifications ont, à leur tour, entraîné des modifications de la quantité filtrée par unité de temps ("charge filtrée").

Les rats utilisés dans ces expériences ont été de jeunes rats mâles, dérivés de la souche Sprague-Dawley, élevés et fournis par Iffa-Credo, centre de recherche et d'élevage des Oncins, 69210 St-Germain-sur l'Arbres, France. Leur poids a varié entre 180 et 220 g. Ils ont été mis à jeûn mais ont eu libre accès à l'eau pendant la nuit précédant les expériences.

Pendant toute la durée d'une expérience, une solution a été perfusée par la veine jugulaire à l'aide d'une pompe reliée à une seringue ("Unita", Braun-Melsungen, Allemagne). La vitesse de perfusion a été de 50 µl/minute. Avant le début de la perfusion, 5 ml/kg de poids corporel ("priming") de la même solution ont été injectés afin d'élever la concentration plasmatique d'inuline (et d'acide urique suivant le groupe de rats) à un taux maintenu ensuite par la perfusion continue.

La solution perfusée a contenu : 5 g % d'inuline (Laevosan-Gesellschaft, Linz/D., Austria); 5 g % (275 mM) de mannitol (Siegfried, Zofingen), afin d'augmenter le débit urinaire; 100 mM de trométamol (THAM, Fluka AG, Buchs SG), base augmentant la solubilité de l'acide urique (Boudry, 1971) et 65 mM de NaCl (E.Merck, Darmstadt). Le ph a été ajusté à 7,4 avec de l'HCl 2 N. Les expériences de microponction ont été faites dans différents groupes de rats, ayant des taux plasmatiques d'acide urique différents grâce à des perfusions variables d'acide urique :

- le groupe de rats A a reçu une perfusion sans acide urique.
- le groupe de rats B a été perfusé à raison de 0,3µM d'acide urique par minute.
- le groupe de rats C a été perfusé à raison de 0,75µM d'acide urique par minute.
- le groupe de rats D a été perfusé à raison de 1,4µM d'acide urique dissous à l'aide de 0,35µM de carbonate de lithium. Le carbonate de lithium n'interfère pas avec l'excrétion rénale de l'acide urique (Steele et coll., 1974).
- le groupe de rats E a été perfusé à raison de 0,75µM d'acide urique et 1,3µM d'oxonate de potassium par minute. L'oxonate de potassium (Calbiochem, San Diego, Calif. 92112) est un inhibiteur de l'uricase hépatique (Johnson et coll., 1969); il a été ajouté dans le but d'obtenir un taux plasmatique d'acide urique élevé; en effet l'inhibition de l'activité de l'uricase hépatique chez le rat augmente considérablement la concentration plasmatique d'acide urique. Il n'est pas possi-

ble d'augmenter la concentration plasmatique d'acide urique au-dessus de la valeur obtenue dans le groupe de rats E, parce que l'acide urique est précipité dans le liquide tubulaire et l'urine pelvienne, et parce que la filtration glomérulaire diminue à la suite de cette précipitation.

- le groupe de rats F a été perfusé à raison de 1,3µM d'oxonate par minute, sans adjonction d'acide urique, dans le but de vérifier si l'oxonate n'altère pas les transports de l'acide urique. En effet, l'oxonate est un acide organique sécrété par le rein de chien (Yü et coll., 1971) et pourrait interférer avec l'excrétion de l'acide urique. L'excrétion d'acide urique du groupe de rats F a été comparée à celle du groupe de rats D (perfusé à raison de 1,4µM d'acide urique par minute), ces deux groupes ayant approximativement la même concentration plasmatique d'acide urique.

Pour chaque expérience, une période d'équilibration de 40 à 60 minutes après le début de la perfusion (pour permettre aux substances perfusées de s'équilibrer entre les milieux intracellulaire et extracellulaire) a précédé deux périodes de clearance et des échantillons tubulaires ont été prélevés par microponction au cours de ces deux périodes. Ce protocole est représenté dans le tableau 2.1.

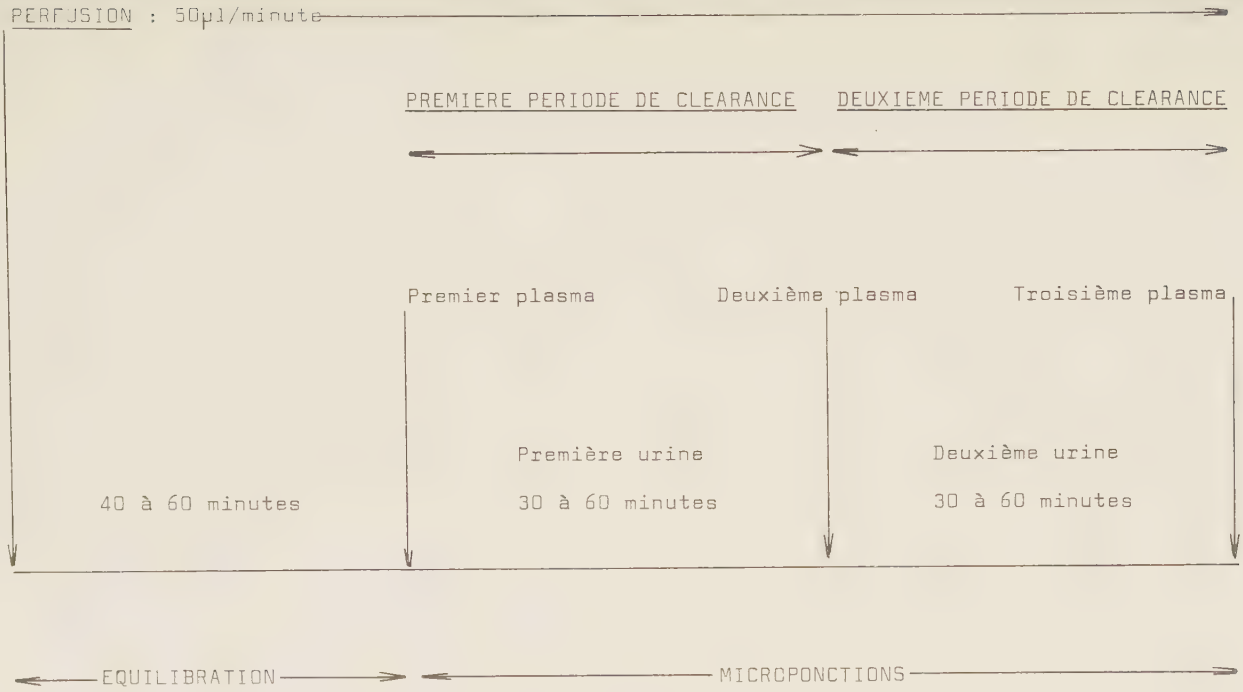


Tableau 2.1 : Protocole expérimental

2.1.2. Expériences de clearance

A taux plasmatique normal d'acide urique, l'excrétion fractionnelle (Curate/Cinuline) observée dans nos expériences de microponction (chapitre 3) a été légèrement plus élevée que celle observée par Boudry (1971a). Nos expériences ont été faites chez les rats anesthésiés au pentobarbital, en revanche celles de Boudry ont été faites chez des rats non-anesthésiés. Les expériences de clearance présentées ici ont eu pour but celui d'étudier si la narcose induite par le pentobarbital sodique pouvait avoir été responsable de l'augmentation de l'excrétion fractionnelle de l'acide urique.

Les rats utilisés dans ces expériences ont été de la même souche et du même élevage que les rats utilisés dans les expériences de microponction. Leur poids a varié entre 180 et 220 g. Ils ont été mis à jeûn mais ont eu libre accès à l'eau pendant la nuit précédant l'expérience.

Les rats ont été perfusés par une solution délivrée à raison de 50µM/minute qui a contenu : 5 g % d'inuline; 5 g % (275 mM) de mannitol; 100 mM de trométamol; 65 mM de NaCl et 0,1 g % (0,6 mM) d'acide urique, afin d'augmenter le taux plasmatique d'acide urique et de faciliter la détermination chimique de la concentration d'acide urique. Le pH a été ajusté à 7,4. Avant le début de la perfusion, 5 ml/kg de poids corporel ("priming") de cette solution a été injectée par voie intraveineuse et les mesures de clearance ont été faites après une heure de perfusion (période d'équilibration).

Le protocole expérimental est représenté dans le tableau 2.2. 5 groupes de rats ont été étudiés :

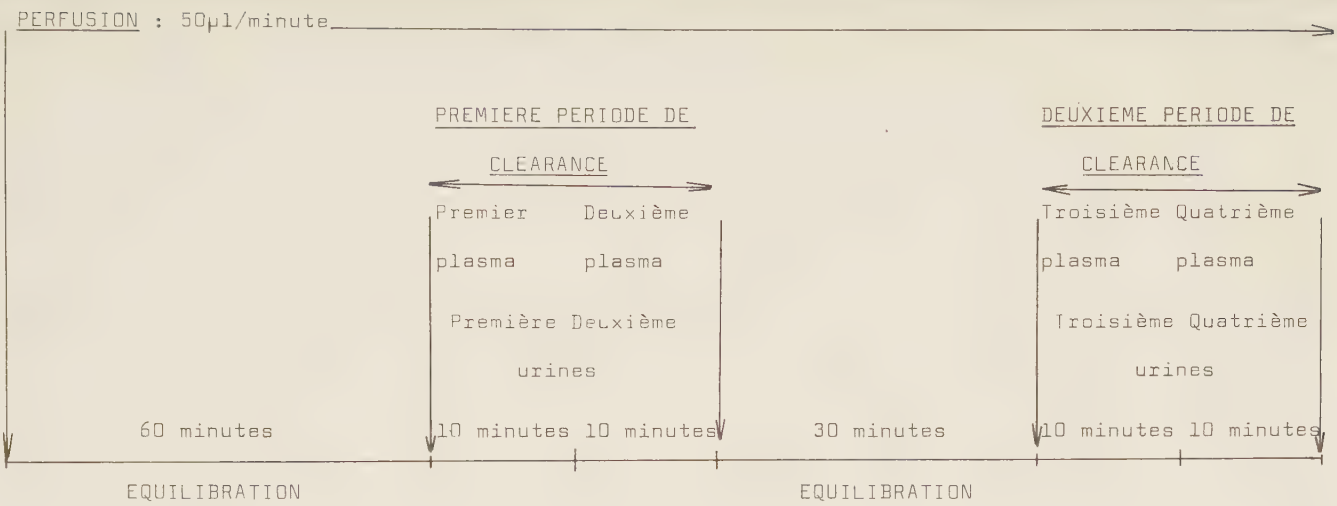
Groupe de rats 1 : rats non-anesthésiés puis anesthésiés au pentobarbital sodique : deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites sur les rats non-anesthésiés. Des échantillons de sang ont été pris par incision de la veine saphène, méthode couramment utilisée chez des rats non-anesthésiés. Après injection intraveineuse de pentobarbital sodique, deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites après une période d'équilibration de 30 minutes. Au cours de cette deuxième période de clearance, les échantillons de sang ont été pris à la carotide.

Groupe de rats 2 : rats non-anesthésiés pendant toute l'expérience : deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites chez les rats non-anesthésiés. Après 30 minutes, deux nouvelles mesures ont été faites dans les mêmes conditions. Ces expériences ont permis de contrôler que l'excrétion fractionnelle de l'acide urique ne s'est pas modifiée au cours du temps. Les rats étant non-anesthésiés, les échantillons de sang ont été pris par incision de la veine saphène.

Groupe de rats 3 : rats anesthésiés à l'éther puis au pentobarbital sodique : deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites sous anesthésie à l'éther. Après une injection intraveineuse de pentobarbital sodique, deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites après 30 minutes d'équilibration. Le sang a été prélevé à la carotide sous éther et sous pentobarbital sodique.

Groupe de rats 4 : rats non-anesthésiés puis anesthésiés au pentobarbital sodique : deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites sur les rats non-anesthésiés. Après une injection intraveineuse de pentobarbital sodique, deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites après 30 minutes d'équilibration. Les échantillons de sang ont été pris à la carotide dans la période sans anesthésie et dans la période sous anesthésie.

Groupe de rats 5 : rats non-anesthésiés : deux mesures de clearance de 10 minutes ont été faites sur les rats non-anesthésiés. Les échantillons de sang ont été pris simultanément à la carotide et par incision de la veine saphène.



Groupe 1	EVEIL	ANESTHESIE AU PENTOBARBITAL
Groupe 2	EVEIL	EVEIL
Groupe 3	ANESTHESIE A L'ETHER	ANESTHESIE AU PENTOBARBITAL
Groupe 4	EVEIL	ANESTHESIE AU PENTOBARBITAL
Groupe 5	EVEIL	———

Tableau 2.2 : Protocole expérimental

2.2. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE DES MICROPONCTIONS EN ECOULEMENT LIBRE

A. Préparation du rat

Les rats ont été anesthésiés par injection dans une veine de la queue de 35 mg/kg de poids corporel de pentobarbital sodique (Nembutal^{R}, Abbott).

Les animaux ont été placés sur une table chauffante autoréglante et leur température rectale a été maintenue à 37^{o}C. Un cathéter de polyéthylène PE 50 a été placé dans la veine jugulaire pour la perfusion des solutions décrites précédemment (2.1.1.). Un cathéter de polyéthylène PE 25, contenant une solution d'héparine pour éviter toute coagulation du sang, a été placé dans l'artère fémorale pour les prélèvements de sang. Un cathéter de polyéthylène PE 100 a été placé dans la vessie urinaire par incision abdominale. Une trachéotomie a été effectuée.

Le rat a ensuite été placé sur le côté droit et le flanc gauche a été incisé. Le rein gauche a été séparé de la graisse périrénale puis, afin de l'immobiliser, placé dans une capsule en plastique. Il a été recouvert d'huile minérale chauffée à 37^{o}C, pour éviter un dessèchement. Pour toutes les expériences, le rein a été décapsulé. Ces expériences de microponction exigeant la collection d'urine finale pour des analyses chimiques et pour la mesure du débit urinaire, un cathéter de polyéthylène PE 25 a été placé dans l'uretère gauche, ainsi le

débit urinaire des deux reins a pu être comparé; nous n'avons ponctionné que les reins dont le débit urinaire n'a pas été inférieur de plus de 5 % à celui du rein controlatéral.

B. Prélèvement de liquide tubulaire

Les micropipettes utilisées pour prélever le liquide tubulaire ont été préparées à partir de tubes de verre (Sci. Glass Apparatus Co. Inc., Bloomfield, N.Y.) de 1,5 à 2 mm de diamètre externe. Ces capillaires, d'une longueur de 15 cm environ, ont été placés dans un étireur électrique (Industrial Acience Associates, inc., 63-15 Forest Ave., Ridgewood, N.Y. 11227) qui chauffe la partie médiane du capillaire jusqu'au point de fusion du verre et, par un étirement progressif, le sépare en deux, avec production de deux micropipettes identiques. La taille et la forme de la pointe de ces pipettes peuvent être modifiées en ajustant la force d'étirement et en réglant la quantité de chaleur délivrée au verre, Ces pipettes ont ensuite été introduites dans un micromanipulateur et la pointe aiguisée sur une pierre tournante. Le diamètre externe de la pointe de la pipette a été de 10 à 12µ pour ponctionner les tubules proximaux, de 8 à 9µ pour les tubules distaux et de 12 à 15µ pour la localisation du point de ponction à l'aide de latex (voir plus loin).

Le rein a été éclairé par une fibre lumineuse. Les microponctions ont été faites sous une loupe binoculaire (Leitz), aggrandissant de 140 fois. Les micropipettes ont été remplies

d'huile minérale colorée par l'adjonction de 20 % de noir de Soudan. Un micromanipulateur (Leitz) a été utilisé pour permettre des mouvements rapides et précis de la micropipette vers la surface du rein, puis dans les lumières tubulaires. Avant de collecter le liquide tubulaire, une goutte d'huile colorée a été injectée dans le tubule pour reconnaître le site de ponction et la direction de l'écoulement du liquide tubulaire. Pour éviter la contamination des échantillons de liquide tubulaire par du liquide tubulaire refluant des segments inférieurs (ceci est surtout important pour les tubules distaux), une colonne d'huile d'environ deux fois le diamètre du tubule a été injectée et maintenue en aval de la pipette pendant toute la durée de ponction. Le liquide tubulaire a été alors collecté, la vitesse de collection a été adaptée à la vitesse du flux urinaire en contrôlant la position de l'huile en aval de la pipette (fig.2.1). Des mouvements respiratoires soudains et profonds de l'animal ou un déplacement mineur de la pipette pouvant être fréquents, il a été nécessaire de vérifier à tout moment la position de cette colonne; des échantillons d'urine tubulaire de 50 à 100nl ont été obtenus pendant des périodes de collection de 5 à 10 minutes.

Fig.2.1 : Technique de microponction dans un segment tubulaire proximal

Après la collection et pour identifier son site, une injection de latex néoprène (Latex 601-A;Dolder Ltd Basle/Switzerland), dilué de 1 à 4 dans de l'eau distillée, a été faite au point de ponction. A la fin de l'expérience, le rein a été prélevé de l'animal, macéré dans un mélange de 50 % d'HCl concentré et 50 % d'eau distillée et gardé à 37°C pendant une heure, ce traitement permettant la solidification du latex et la macération du tissu rénal. Le rein a été ensuite lavé à l'eau distillée puis disséqué sous une loupe binoculaire, à l'aide de fines aiguilles. Lors d'injections satisfaisantes, les divers segments constitutifs du néphron ont pu être reconnus et le site de ponction dans les parties contournées proximales et distales du néphron identifié. Aucun glomérule n'a pu être ponctionné, ces derniers ne se trouvant pas à la surface du rein

dans la souche de rats utilisés. La localisation au latex n'a pas été satisfaisante pour toutes les ponctions; toutefois certains critères ont permis au moment de la ponction de reconnaître les convolutions proximales des convolutions distales, tels que la luminosité de l'intérieur du tubule et l'épaisseur de la membrane tubulaire. D'autre part le rapport des concentrations d'inuline dans le liquide tubulaire et le plasma, ou TF/Pinuline, indique les mouvements de l'eau, ce rapport a pu être considéré comme une fonction de la distance à partir du glomérule et a été utilisé pour localiser la ponction non pas de façon anatomique mais physiologique; en effet, l'eau étant réabsorbée le long du néphron, le rapport TF/Pinuline augmente le long du néphron.

Les échantillons tubulaires ont été transferrés sur des plaques de verre siliconnées, sous huile de paraffine et conservés à 4°C jusqu'au moment de l'analyse.

Les concentrations d'inuline et d'acide urique ont été déterminées dans des échantillons plasmatiques, de 150 à 300µl, dans des échantillons urinaires, de 0,5 à 2 ml et dans des échantillons de liquide tubulaire, de 50 à 150 nl (périodes de collection variables).

2.3. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE DE CLEARANCE

2.3.1. Mesure de clearance chez des rats anesthésiés

Les rats ont été préparés de la même manière que pour les expériences de microponction (2.2), mais le rein n'a pas été mis à nu.

2.3.2. Mesure de clearance chez des rats non-anesthésiés

Les mesures de clearance chez les rats éveillés ont été pratiquées selon la méthode décrite par Bonjour (1966) et utilisée par Boudry (1971a). Le rat a été placé dans une cage restrictive; cette dernière a consisté en un cylindre en pléxiglas, ayant un disque amovible situé à la partie antérieure et pouvant être ajusté selon la taille de l'animal. En outre, l'immobilisation de l'animal a été assurée par la fixation des pattes postérieures à l'extérieur de la cage à l'aide de bandes adhésives. Le pénis a été sorti par un office médian, au-dessous duquel a été placé un tube à essais. Cette cage a permis des collections urinaires sans pertes importantes; cependant l'application autour du pénis d'une pâte siliconnée a été indispensable pour éviter complètement les pertes urinaires dans la cage de restriction. La solution de perfusion (décrite sous 2.1.2) a été administrée dans une veine de la queue. Les prises de sang ont été effectuées soit par incision des veines dorsales des pattes postérieures (veines saphènes), méthode utilisée couramment chez les rats non-anesthésiés, soit à la carotide, comme

cela se fait chez les rats anesthésiés, Dans ce dernier cas, un cathéter de polyéthylène PE 25 a été placé dans la carotide, 3 heures avant le début de l'expérience, sous anesthésie passagère à l'éther.

Pour les mesures de clearance chez les rats anesthésiés et chez les rats non-anesthésiés, les concentrations d'inuline et d'acide urique ont été déterminées dans les échantillons plasmatiques et urinaires.

2.4. DOSAGE DE L'INULINE

L' inuline, polymère du fructose (poids moléculaire d'environ 5'000), a été utilisée pour mesurer la filtration glomérulaire et la réabsorption d'eau au niveau des tubules rénaux. Les concentrations d'inuline dans les échantillons plasmatiques, urinaires et tubulaires ont été déterminées par la méthode fluorimétrique de Vurek et Pegram (1966).

A. Principe du dosage

L'inuline est transformée en fructose par hydrolyse acide. Le fructose réagit avec la dimédone dissoute dans de l'acide phosphorique concentré et produit un composé qui émet une fluorescence d'intensité maximale à la longueur d'onde de 420nm lorsqu'il est excité à la longueur d'onde de 366nm. La fluorescence relative du fluorophore dépend de la concentration d'inuline; pour des concentrations faibles d'inuline, la relation est linéaire.

B. Solutions

1) Inuline (purissimum, Laevosan-Gesellschaft, Linz/D., Austria) : des solutions-étalon de 0 à 300 mg % pour le dosage des échantillons plasmatiques et urinaires et de 0 à 2 g % pour le dosage des échantillons tubulaires ont été préparées dans l'eau distillée et conservés à 4°C.

2) Réactif à la dimédone

2 g (14,3mM) de dimédone (E. Merck, Darmstadt) ont été dissous dans 100 ml d'acide phosphorique concentré.

3) Acide phosphorique (Fluka A.G., Buchs S.G., Switzerland) : acide o-phosphorique, 84-85 %

C. Dosage dans les échantillons plasmatiques et urinaires

Pour déprotéiniser les échantillons de plasma, 25µl de plasma ont été mélangés avec 125µl d'acide trichloracétique 10 % (dilution de 1 à 6) et centrifugés à 8'000 g; 50µl du surnageant ont été ajoutés à 1 ml de réactif à la dimédone. 100 µl de chaque solution-étalon (0 à 300 mg %) et d'échantillons urinaires préalablement dilués 20 à 40 fois dans l'eau distillée, afin d'obtenir une concentration d'inuline comprise entre 100 et 200 mg %, ont été ajoutés à 500µl d'acide trichloracétique 10 % (dilution 1 à 6) et 50µl de chaque échantillon ainsi traité ont été ajoutés à 1 ml de réactif. Le mélange a ensuite été transférré dans des capillaires de verre (Microcaps, 100ul capacity, Drummond Scientific. Co, 500 Parkway, Broomall, Pensylvania 19008, coupés en deux), soigneusement lavés selon la méthode de Vurek et Pegram (1966). Après avoir été scellées à la flamme aux deux extrémités, ces cuvettes ont été centrifugées dans

une centrifugeuse pour hématocrite, chauffées au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes et refroidies à température ambiante. Le fluorophore obtenu est pratiquement stable pendant plusieurs jours s'il est gardé à l'abri de la lumière. Chaque échantillon plasmatique ou urinaire a été dosé en parallèle. Les parallèles s'écartant de plus de 5 % ont été éliminés.

La fluorescence a été lue à l'aide d'un fluoromicrophotomètre Aminco (American Instrument Co., Silver Spring, Maryland, USA), équipé d'une lampe au mercure de 85 watt. Un filtre de sélection de la lumière d'entrée a été placé entre la lampe et l'échantillon (Corning CS 7-60 filters, Corning Glass Works, Corning, New York 14830), la lumière émise étant filtrée par un deuxième filtre (Baird-Atomic 4060 A, Baird-Atomic, Inc., Cambridge, Massachusetts 02138). Les capillaires ont été placés dans un porte-cuvette construit spécialement à leur dimension.

D. Dosage dans les échantillons tubulaires

2,3µl de réactif à la dimédone ont été transferrés dans les capillaires décrits sous C., au moyen d'une microseringue (Precision Sampling corporation, Baton Rouge, La., USA 70815). Afin d'éviter toute évaporation, les échantillons tubulaires et les solutions-étalon ont été placées sous huile sur des plaquettes de verre siliconnées sur le fond et ont été ajoutées au réactif au moyen de micropipettes à constriction d'environ 10nl. Puis les capillaires ont été scellés à la flamme, les échantillons ont été agités par plusieurs cen-

trifugations successives, les extrémités des capillaires étant inversées, et chauffés à 100°C au bain-marie pendant 10 minutes. Les volumes des échantillons tubulaires ont permis d'effectuer de un à trois dosages par échantillon.

E. Conservation de l'inuline dans les échantillons plasmatiques et urinaires

Comme il n' a pas toujours été possible de doser l'inuline le jour de l'expérience, les échantillons plasmatiques et urinaires ont été traités à l'acide trichloracétique 10 % dès leur prélèvement, puis conservés au congélateur jusqu'au jour du dosage; les solutions-étalon ont subi le même traitement.

Pour contrôler que ce traitement n'a pas modifié la concentration d'inuline, cette dernière a été déterminée dans des échantillons plasmatiques le jour de l'expérience et un jour plus tard, les concentrations respectives ont été 173 ± 4 et 171 ± 12 mg % ($\bar{x}$ ± SE; n = 7)*. Dans d'autres échantillons plasmatiques, la concentration d'inuline a été déterminée le jour de l'expérience et une semaine plus tard, les concentrations ont été respectivement, 174 ± 5 et 172 ± 7 mg % (n = 14). Le même contrôle a été fait pour les échantillons urinaires : le jour même et le lendemain, les concentrations

* $\bar{x}$ ± SE = moyenne ± erreur moyenne de la moyenne
n = nombre d'échantillons
Tous les résultats présentés dans ce travail sont exprimés de cette manière.

d'inuline ont été respectivement 4'623 ± 293 et 4'751 ± 308 mg % (n = 11); dans une autre expérience, les concentrations ont été 4'735 ± 373 le premier jour et 4'770 ± 245 mg % (n = 7) une semaine plus tard. Aucune différence n'a été significative (test de Student des différences couplées).

.'. DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE

Les concentrations d'acide urique dans les échantillons plasmatiques et urinaires ont été déterminées par la méthode enzymatique de Praetorius et Poulsen (1953) et simultanément par la méthode fluorimétrique de Bloch et Lata (1970), adaptée à des échantillons de quelques nanolitres par Roch-Ramel et coll., 1973b, en préparation). Les concentrations d'acide urique dans les échantillons tubulaires ont été déterminées par la méthode fluorimétrique; en effet, la méthode enzymatique bien que très spécifique n'est pas suffisamment sensible pour être applicable au dosage d'échantillons tubulaires. L'utilisation et la comparaison de ces deux méthodes seront discutées plus loin.

2.5.1. Dosage par la méthode enzymatique

A. Principe du dosage

L'acide urique absorbe la lumière ultraviolette. L'absorption maximale se situe entre 290 et 295 nm. Cette absorption disparaît complètement après addition d'uricase, enzyme transformant l'acide urique en allantoïne; la concen-

tration d'acide urique dans une solution est proportionnelle à la différence d'extinction avant et après l'action de l'enzyme.

B. Solutions

1) Solution-étalon d'acide urique : une solution de 10 mg % (600µM/l) d'acide urique (Fluka A.G., Buchs S.G.) a été préparée dans une solution de Na_2HPO_4 M/15, conservée à 4°C et renouvelée tous les 15 jours.

2) Tampon glycine 0,66 M : 25 g (0,33 M) de glycine cristalline ont été dissous dans 200 ml d'eau distillée, 110 ml de NaOH 1N ont été ajoutés et le volume ajusté à 500 ml avec de l'eau distillée. 3 ml de chloroforme ont été ajoutés afin de diminuer la contamination bactérienne. Cette solution, stable plusieurs semaines, a été conservée à 4°C.

3) Tampon glycine M/15 : la solution 2) a été diluée de 1 à 10 avec de l'eau distillée et ajustée à pH 9,3 à l'aide d'un pH mètre.

4) Solution d'enzyme : une solution d'uricase de foie de porc (Boehringer Mannheim GmbH; 2 mg de protéine/ml de glycine) a été diluée 5 fois dans du tampon glycine M/15 (solution 3) avant l'emploi.

C. Dosage

Les protéines, comme l'acide urique, absorbent la lumière ultraviolette et interfèrent avec le dosage de faibles

concentrations d'acide urique. Pour éliminer cette interférence, les échantillons plasmatiques ont été déprotéinisés par l'acide perchlorique selon la méthode décrite par Poulsen et Praetorius (1954) : 300µl de perchlorate 5 % ont été ajoutés à 100µl de plasma et 100µl d'eau distillée, le mélange a été centrifugé; à 400µl du surnageant ont été ajoutés 100µl de KOH 8 % et 100µl de tampon glycine 0,66 M; le mélange a été mis dans de la glace pendant 5 minutes puis centrifugé et l'acide urique a été dosé dans le surnageant; selon la concentration d'acide urique, nous avons fait une dilution supplémentaire du surnageant.

Les échantillons urinaires ont été dilués dans le tampon glycine M/15, entre 100 et 2'000 fois selon la concentration d'acide urique.

Puis 400µl de chaque échantillon plasmatique ou urinaire ainsi traité ont été transferrés dans une cuvette de quartz, de même que 400ul de la solution de glycine M/15 pour le blanc et 400µl de la solution de glycine M/15 + 10µl de solution-étalon à 600µM/l d'acide urique pour le standard. Après avoir lu chaque extinction avec un spectrophotomètre Zeiss, à la longueur d'onde 292,5 nm, 5µl de la solution d'uricase ont été ajoutés dans chaque cuvette. Après 45 minutes, puis une heure afin de s'assurer que la réaction ait été terminée à la lecture précédente, les extinctions ont été relues.

D. Calculs

Le coefficient d'absorption de l'acide urique à la longueur d'onde de 292,5 nm est de 0,0745 pour une concentration d'acide urique de 1µg/ml (chemin lumineux 10mm). Si :

E_{e1} = extinction de l'échantillon avant uricase

E_{e2} = extinction de l'échantillon après uricase

$\Delta E_e = E_{e1} - E_{e2}$

E_{b1} = extinction du blanc avant uricase

E_{b2} = extinction du blanc après uricase

$\Delta E_b = E_{b2} - E_{b1}$ est l'augmentation de l'extinction du blanc observée après addition de l'uricase et représente la propre extinction de l'enzyme,

alors la différence de l'extinction de l'échantillon après action de l'uricase est :

$\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_b$

et la concentration d'acide urique dans l'échantillon est égale à :

(ΔE / 0,0745 x facteur de dilution) µg/ml.

E. Conservation de l'acide urique

Comme il n'a pas toujours été possible d'effectuer le dosage d'acide urique le jour de l'expérience, les échantillons plasmatiques et urinaires ont été conservés au congélateur jusqu'au jour du dosage. Pour contrôler que ce traitement n'a pas modifié la concentration d'acide urique, cette dernière a été déterminée dans des échantillons plasmatiques le jour de l'expérience et le jour suivant, elle a été respectivement 186 $\pm$ 42 et

168 ± 42 µM/l (n = 7); dans d'autres échantillons plasmatiques, la concentration d'acide urique a été déterminée le jour de l'expérience et une semaine plus tard, elle a été respectivement 108 ± 30 et 108 ± 24µM/l (n = 5). Le même contrôle a été fait pour les échantillons urinaires, la concentration d'acide urique a été le jour de l'expérience et une semaine plus tard respectivement 2'100 ± 260 et 2'000 ± 230µM/l (n = 9). Aucune de ces différences n'a été significative (test de Student des différences couplées).

2.5.2. Dosage par la méthode fluorimétrique

a. Principe du dosage

L'oxydation de la scopolétine, composé fluorescent dont la longueur d'onde d'excitation est 348nm et la longueur d'onde d'émission 465nm, en un composé non fluorescent, est retardée par la présence d'acide urique, ce dernier étant oxydé par le système oxydant, composé de peroxyde d'hydrogène et de peroxydase. Le retard dans la chute de fluorescence de la scopolétine est une fonction linéaire de la concentration d'acide urique (Bloch et Lata, 1970).

La figure 2.2 représente trois courbes obtenues lors d'un dosage d'acide urique par fluorimétrie. L'une (courbe 1) indique la chute de la fluorescence de la scopolétine après addition de peroxydase (temps 0) en absence d'acide urique. Les autres courbes (courbes 2 et 3) indiquent le retard de la chute de la fluorescence de la scopolétine après addition de pero-

xydase provoqué par la présence respective de 60 et 90µM/l d'acide urique. Les droites B et B' sont les tangentes aux points d'inflexion (F') des courbes et sont déterminées graphiquement. F_x représente la fluorescence initiale. T' et T" sont les intersections des droites B et B' avec F_x. T^o est le temps correspondant à l'addition de peroxydase. La longueur des plateaux représentée par la différence $T - T^o$ est proportionnelle à la concentration d'acide urique (fig.2.3).

Fig.2.2 : Enregistrement obtenu lors d'un dosage fluorimétrique de l'acide urique.

La courbe 1 reflète la chute de la fluorescence de la scopolétine après addition, au temps T^o, de peroxydase. Les courbes 2 et 3 reflètent le retard de la chute de la fluorescence dû à la présence d'acide urique (respectivement 60 et 90µM/l).

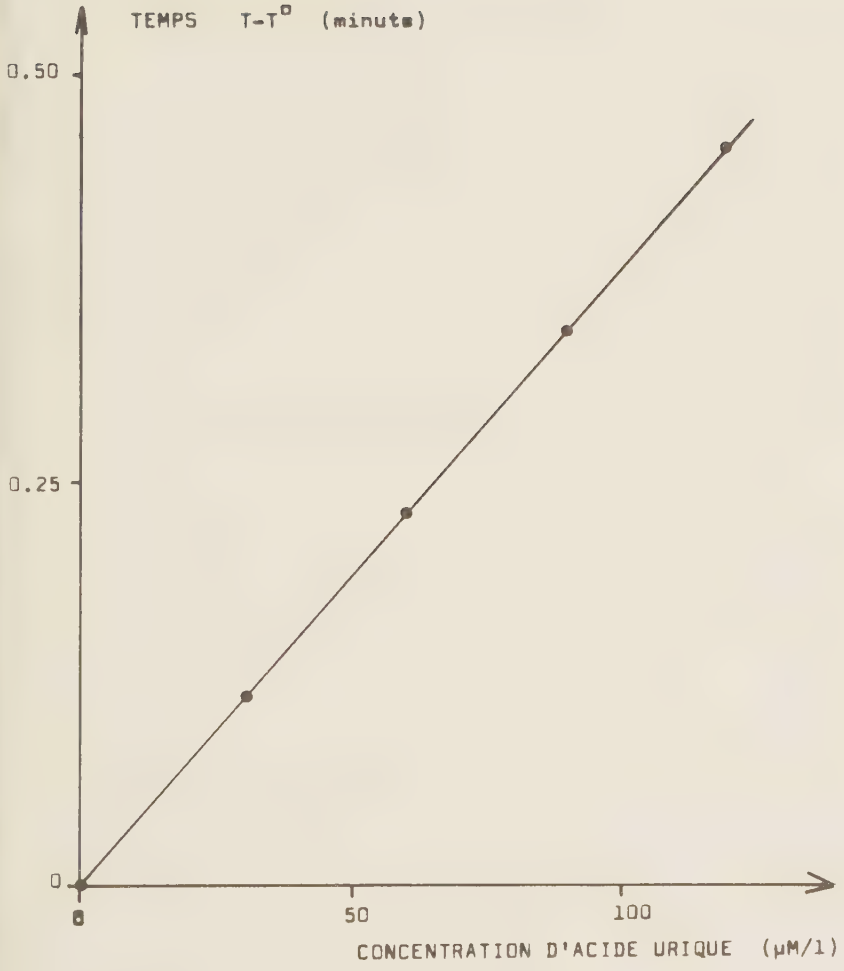


Fig.2.3 : Courbe d'étalonnage de l'acide urique.

Le temps $T-T^{o}$ représente le retard de la chute de fluorescence de la scopolétine après addition de peroxydase, dû à la présence d'acide urique.

B. Dosage dans les échantillons plasmatiques et urinaires

a. Solutions :

1) Scopolétine (Fluka A.G., Buchs S.G.) : une solution de 2,5 mg dans 100 ml d'eau distillée, portée à ébullition, a été conservée à 4°C.

2) Peroxyde d'hydrogène : une solution à 30 % a été diluée 1'000 fois et conservée à 4°C.

3) Peroxydase (Horseradish peroxydase, Boehringer, Grade II) : avant chaque dosage, 0,5 mg ont été dissous dans 1 ml de tampon phosphate (solution 4) et la solution a été maintenue dans de la glace pendant toute la durée du dosage.

4) Tampon phosphate pH 7 : pour obtenir ce pH, 41,3 ml de KH_2PO_4 M/15 ont été ajoutés à 58,7 ml de Na_2HPO_4 M/15.

b. Dosage

La déprotéinisation des échantillons plasmatiques ainsi que la dilution des échantillons urinaires ont été les mêmes que pour le dosage enzymatique. Pour chaque dosage, une courbe d'étalonnage de la concentration d'acide urique de 6 à 60 µM/l a été préparée dans du tampon glycine M/15 à partir de la solution-étalon 600µM/l déjà mentionnée(2.5.1.). Dans une cuvette pour fluorescence ont été ajoutés successivement : 2 ml de tampon phosphate, 300µl d'échantillon plasmatique ou urinaire ou de solution-étalon, 20µl de peroxyde d'hydrogène et 20µl de scopolétine. Après avoir mélangé le contenu de la cuvette, cette dernière a été placée dans un compartiment du spectro-

fluorimètre (Farrand Optical Co., Inc. New York) et l'appareil a été ajusté pour donner arbitrairement une valeur d'émission de 90 %. Puis la réaction d'oxydation a été déclenchée au temps 0 par l'addition de 20µl de peroxydase diluée, le contenu de la cuvette a été mélangé, replacé dans le fluorimètre et la réaction suivie grâce à un enregistreur (W + W Recorder 1100).

C. Dosage dans les échantillons tubulaires

a. Solutions

Les mêmes solutions de scopolétine et peroxyde d'hydrogène ont été utilisées (B). Cependant, lors de chaque dosage, la scopolétine a été diluée de 1 à 150 et le peroxyde d'hydrogène de 1 à 50 dans du tampon phosphate pH 7 (solution 4), puis à volume égal, ces deux solutions ont été mélangées. Ces solutions ont été gardées dans de la glace pilée et refaites toutes les 45 minutes. Une solution concentrée de peroxydase a été préparée : 2 mg ont été dissous dans 1 ml de tampon phosphate, puis diluée toutes les 15 minutes 50 à 100 fois, la peroxydase ainsi diluée étant instable. Cette solution a été également conservée dans de la glace. Pour chaque dosage, une courbe standard d'acide urique de 60 à 600µM/l a été préparée.

b. Dosage

Une microseringue (Micro-pettor; Müllener Gerätebau A.G., Arni) a été utilisée pour introduire 4 µl du mélange scopolétine + peroxyde d'hydrogène dans un capillaire de verre

(Microcaps, 150µl capacity, Drummond Scientific. Co., 500 Parkway, Broomall, Pennsylvania 19008, coupés par la moitié); ces capillaires ont été lavés dans les solvants recommandés par Bloch et Lata (1970) puis placés dans une solution de silicone (Rhodosil P240, Rhône Poulène, Paris; solution de 7 % dans chloroforme), ensuite bouillis dans de l'eau distillée pendant 10 minutes et finalement séchés.

Au mélange scopolétine + peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés 10 à 80nl de solution-étalon ou d'échantillon tubulaire, suivant la concentration d'acide urique attendue dans l'échantillon et le volume de l'échantillon obtenu par microponction. Une extrémité du capillaire a été scellée à la flamme et d'un mouvement énergique de la main, le mélange a été déplacé au fond de la cuvette ainsi formée. Le capillaire a été ensuite agité à l'aide de la vibration d'un petit moteur et placé dans un porte-cuvette spécialement construit pour lire la fluorescence de ces capillaires. Le fluorimètre a été ajusté à 90 % d'émission. Au temps 0, à l'aide d'une microseringue (Scientific glass engineering PT4. LTD.Australia), 0,5µl de la solution de peroxydase diluée a été ajouté, le contenu de la cuvette a été à nouveau agité puis la décroissance de la fluorescence a été enregistrée. Le point essentiel de cette technique est que la centrifugation faite par une forte secousse de la main et l'agitation soient effectuées le plus rapidement possible malgré le faible volume de liquide.

Les volumes des échantillons tubulaires ont permis d'effectuer de un à trois dosages.

c. Remarque

L'adaptation de la méthode de Bloch et Lata a été décrite par Roch-Ramel et coll., (1973b) et utilisée chez le singe Cebus. Chez ce dernier, des substances réductrices trouvées dans l'urine réagissaient avec la scopolétine et étaient détruites par le peroxyde d'hydrogène; il était ainsi nécessaire d'ajouter le peroxyde d'hydrogène aux échantillons urinaires avant la scopolétine. Les échantillons plasmatiques, tubulaires et les solutions-étalon étaient traités de la même manière. Chez le rat, et dans les conditions expérimentales choisies, nous avons pu montrer qu'il n'était pas nécessaire d'ajouter le peroxyde d'hydrogène avant la scopolétine; nous avons déterminé dans des échantillons urinaires la concentration d'acide urique : 1) en ajoutant le peroxyde d'hydrogène à l'échantillon urinaire avant la scopolétine et 2) en ajoutant simultanément le peroxyde d'hydrogène et la scopolétine à l'échantillon urinaire; les concentrations d'acide urique ont été respectivement 1'050 $\pm$ 110 et 1'080 $\pm$ 110 µM/l (n = 20), cette différence n'a pas été significative (test de Student des différences couplées). Par conséquent, pour le dosage des échantillons tubulaires, la scopolétine et le peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés simultanément.

2.5.3. Contrôles de la validité de la méthode fluorimétrique

Pour le dosage de l'acide urique, seule la méthode enzymatique est spécifique, Yü et coll., (1957b) ont jugé que

toute méthode ne faisant pas intervenir l'uricase, est sujette à caution, par exemple, la méthode colorimétrique de Folin, basée sur la réduction de l'acide phosphotungstique par l'acide urique, surestime la concentration d'acide urique dans des échantillons d'urine pelvienne (Roch-Ramel et coll., en préparation). La méthode fluorimétrique de Bloch et Lata (1970) n'est pas entièrement spécifique non plus. En effet certaines substances interfèrent avec l'oxydation de la scopolétine : Bloch et Lata mentionnent par exemple les oestrogènes, l'acide ascorbique, la L-cystéine et la 5-hydroxytryptamine. Afin de nous assurer que dans nos conditions expérimentales aucune substance n'interfère avec le dosage de façon décelable, nous avons effectué différents contrôles.

A. Absence d'interférence de composés plasmatiques ou urinaires

Du sang et de l'urine ont été prélevés à des rats soumis aux mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour nos expériences de microponction, c'est-à-dire à des rats mâles, mis à jeûn la nuit précédant l'expérience (Roch-Ramel a montré une mauvaise corrélation entre les détermination fluorimétriques et enzymatiques de l'acide urique chez quelques singes Cebus ayant eu libre accès à la nourriture) et sous légère diurèse au mannitol (pour augmenter le débit urinaire). Pour s'assurer de l'absence de substances pouvant interférer avec le dosage, l'acide urique contenu dans ces échantillons plasmatiques et urinaires a été détruit par l'action de

l'uricase puis ces échantillons ont été dosés par fluorimétrie : à 1,5 ml de plasma déprotéinisé et dilué, ainsi qu'à 1,5 ml d'urine diluée, 50µl de solution d'uricase diluée 1 à 5 ont été ajoutés. Après une heure, pour permettre la destruction de tout l'acide urique présent, ces échantillons ont été traités par 0,5 ml de NaOH 2N, pour détruire l'uricase, puis par 0,5 ml d'HCL 2N pour reneutraliser la solution à pH 9,3. Une solution-étalon de 30µM/l d'acide urique a subi le même traitement (par l'uricase, puis par NaOH et HCL), pour contrôler que ce traitement ne modifie pas la réaction d'oxydation de la scopolétine. Au mélange de scopolétine, peroxyde d'hydrogène et tampon phosphate (dosage décrit sous 2.5.2.), 300µl d'échantillons plasmatique (n = 7) ou urinaire (n = 6) ou de solution-étalon traités (n = 7) ont été ajoutés. Après addition de peroxydase, aucun retard dans la chute de la fluorescence de la scopolétine n'a été observé, ce qui indique qu'aucune substance plasmatique ou urinaire n'a interféré avec l'oxydation de la scopolétine.

B. Absence d'interférence de composés ajoutés aux solutions de perfusion

Nous avons contrôlé l'absence d'interférence des substances ajoutées aux différentes solutions de perfusion administrées aux rats par voie intraveineuse dans nos expériences de microponction (telles que le mannitol, le carbonate de lithium et l'oxonate) avec le dosage fluorimétrique. Nous avons dosé par la méthode fluorimétrique la concentration d'acide urique de

solutions-étalon à 0, 6, 30 et 60µM/l, diluées soit dans du tampon glycine M/15, soit dans ce même tampon contenant 1 g % (55 mM) de mannitol ou 10 mg % (1,4 mM) de carbonate de lithium ou 100 mg % (5,1 mM) d'oxonate. Ces substances n'ont pas interféré avec la détermination de l'acide urique.

C. Précision de la méthode

Pour nous assurer d'une bonne reproductibilité de la méthode fluorimétrique, nous avons dosé 10 fois un échantillon plasmatique, urinaire et tubulaire, les concentrations d'acide urique ont été respectivement 68 ± 1 (erreur moyenne relative = ± 1,8 %), 769 ± 10 (erreur moyenne relative = ± 1,3 %) et 352 ± 16 (erreur moyenne relative = ± 4,6 %) µM/l.

Nous avons également contrôlé que différentes concentrations d'acide urique ajoutées à des échantillons plasmatiques ou urinaires ou à du tampon soient retrouvées lors de la détermination par fluorimétrie. Nous avons aussi contrôlé la récupération ("recovery") d'acide urique ajouté à des échantillons tubulaires.Au mélange de scopolétine, peroxyde d'hydrogène et tampon phophate, 300µl d'échantillons plasmatiques, urinaires ou de tampon, ainsi que 20µl de solution-étalon d'acide urique (60, 120 et 180µM/l) ont été ajoutés, puis les concentrations d'acide urique déterminées après l'action de la peroxydase. Les concentrations d'acide urique retrouvées dans les échantillons plasmatiques, urinaires (après soustraction de la concentration endogène d'acide urique) et de tampon ont été respec-

tivement : 62 ± 2 (n = 6), 61 ± 3 (n = 11) et 61 ± 2 (n = 9) µM/l, lorsque 60µM/l ont été ajoutées; 123 ± 2 (n = 6), 123 ± 3 (n = 10) et 127 ± 2 (n = 6) µM/l, lorsque 120µM/l ont été ajoutées et 187 ± 4 (n = 6), 179 ± 7 (n = 7) et 184 ± 4 (n = 9)µM/l, lorsque 180µM/l ont été ajoutées.

Nous avons procédé de même pour les échantillons tubulaires. Au mélange de scopolétine et peroxyde d'hydrogène, 50nl d'échantillon tubulaire ainsi que 30nl de solution-étalon d'acide urique (60, 120, 150, 180 et 240µM/l) ont été ajoutés. Nous avons représenté sur la figure 2.4 la quantité d'acide urique déterminée par fluorimétrie en fonction de la quantité ajoutée aux échantillons tubulaires, en valeur absolue (après déduction de la concentration tubulaire endogène d'acide urique). Les quantités d'acide urique retrouvées par détermination fluorimétrique n'ont pas été significativement différentes des quantités d'acide urique ajoutées aux échantillons tubulaires.

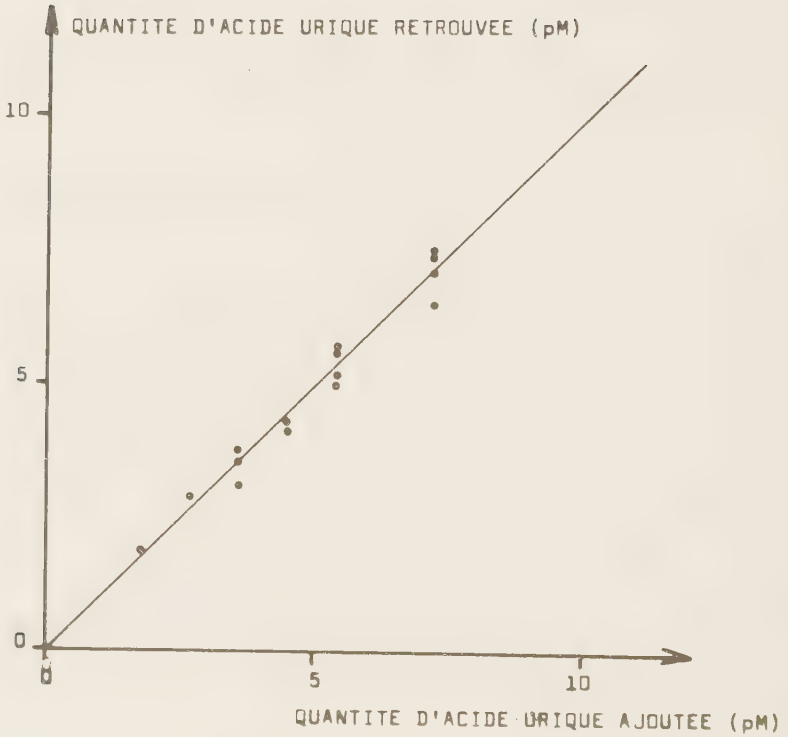


Fig.2.4 : Fidélité de la méthode fluorimétrique pour doser l'acide urique dans les échantillons tubulaires : mesure de "recovery".

———— est la droite d'identité

2.5.4. Comparaison des méthodes enzymatique et fluorimétrique et conclusions

La méthode enzymatique de Praetorius et Poulsen (1953) est spécifique, mais n'est pas assez sensible pour doser l'acide urique dans des échantillons d'urine tubulaire de rat, ceux-ci ayant couramment un volume de 30 à 100nl et le rat ayant un taux plasmatique d'acide urique très faible (40µM/l). Roch-Ramel a adapté la méthode fluorimétrique de Bloch et Lata (1970) pour doser l'acide urique dans les échantillons tubulaires. Cette méthode n'étant pas parfaitement spécifique pour l'acide urique, les conditions expérimentales ont été choisies de telle manière que la concentration d'acide urique mesurée dans les échantillons plasmatiques et d'urine pelvienne soit identique lorsqu'elle est mesurée par la méthode fluorimétrique et la méthode enzymatique.

Au cours de toutes nos expériences nous avons comparé pour chaque échantillon plasmatique et urinaire les deux méthodes de dosage. Les résultats sont montrés sur les figures 2.5 et 2.6. Nous avons représenté, pour les échantillons plasmatiques (fig.2.5) ou pour les échantillons urinaires (fig.2.6), la concentration d'acide urique déterminée par la méthode enzymatique en abscisse, et en ordonnée, la concentration d'acide urique déterminée par la méthode fluorimétrique.

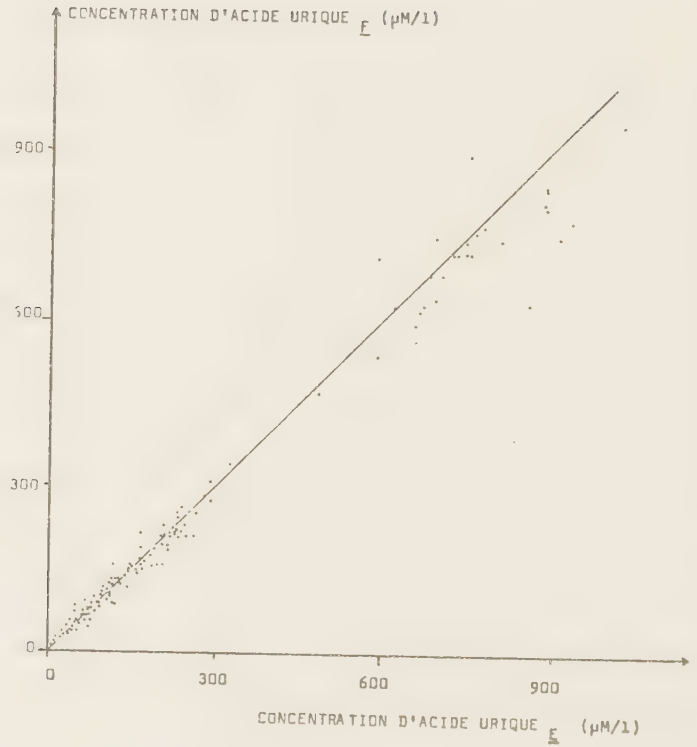


Fig.2.5 : Comparaison des méthodes enzymatique (E) et fluorimétrique (F) pour la détermination de l'acide urique dans les échantillons plasmatiques.

————est la droite d'identité

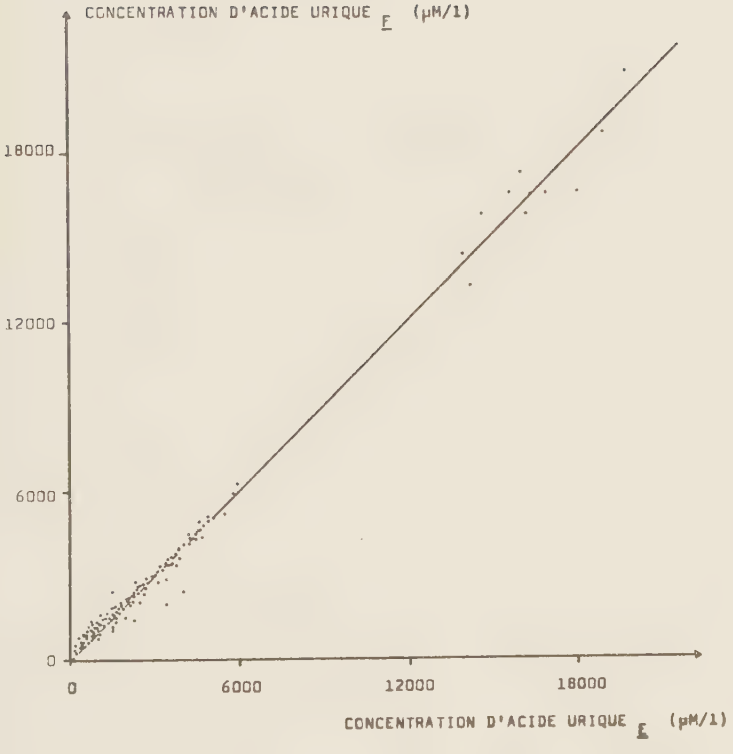


Fig.2.6 : Comparaison des méthodes enzymatique (E) et fluorimétrique (F) pour la détermination de l'acide urique dans les échantillons urinaires.

———— est la droite d'identité

Le rapport moyen des concentrations d'acide urique mesurées dans les échantillons plasmatiques par la méthode fluorimétrique sur les concentrations mesurées par la méthode enzymatique a été de 98,8 $\pm$ 1,4 % (n = 137).

Le rapport moyen des concentrations d'acide urique mesurées dans les échantillons urinaires par la méthode fluorimétrique sur les concentrations mesurées par la méthode enzymatique a été de 103,5 $\pm$ 1,7 % (n = 133).

Dans la série des 75 rats utilisés pour les études de microponctions , seule l'urine d'un rat a donné des résultats en fluorimétrie s'écartant totalement de la valeur obtenue par la méthode enzymatique, les valeurs plasmatiques étant cependant comparables. Ce rat a été éliminé du collectif étudié.

Etant donné la bonne corrélation entre la méthode enzymatique et la méthode fluorimétrique (test de Student des différences couplées), nous en avons conclu que, dans nos conditions expérimentales, l'urine tubulaire pouvait être dosée par fluorimétrie avec précision, en écartant l'hypothèse invraisemblable qu'une substance interférant avec le dosage absente du plasma et de l'urine finale pourrait se trouver dans le liquide tubulaire.

2.5.5. Déprotéinisation plasmatique

A. Ultrafiltration

Dans des expériences préliminaires (de Rougemont et coll., 1973), les plasmas de rats ont été déprotéinisés par la méthode d'ultrafiltration décrite par Boudry (1971). Les plasmas ont été dilués environ 10 fois, selon la concentration d'acide urique, dans du tampon glycine M/15 et ultrafiltrés à 25°C, sous une pression de 4 atmosphères d'azote, avec un appareil Amicon 10 (Amicon, Lexington, Mass., USA), à travers une membrane Sartorius SM 12133 (Sartorius, Göttingen, Federal Republic of Germany).

Dans des expériences de reproductibilité, cependant, nous avons observé que lors de l'ultrafiltration d'échantillons contenant 15 à 300µM/l d'acide urique, environ 15 % de l'acide urique ajouté à la solution ultrafiltrée sont restés fixés à la membrane, même en absence de protéines. En effet, nous avons ultrafiltré différentes solutions de tampon glycine M/15 contenant 15, 30, 60, 150 et 300µM/l d'acide urique et dosé la concentration d'acide urique dans l'ultrafiltrat. Nous avons représenté sur la figure 2.7, la concentration d'acide urique retrouvée dans l'ultrafiltrat en fonction de la concentration d'acide urique contenue dans la solution avant l'ultrafiltration.

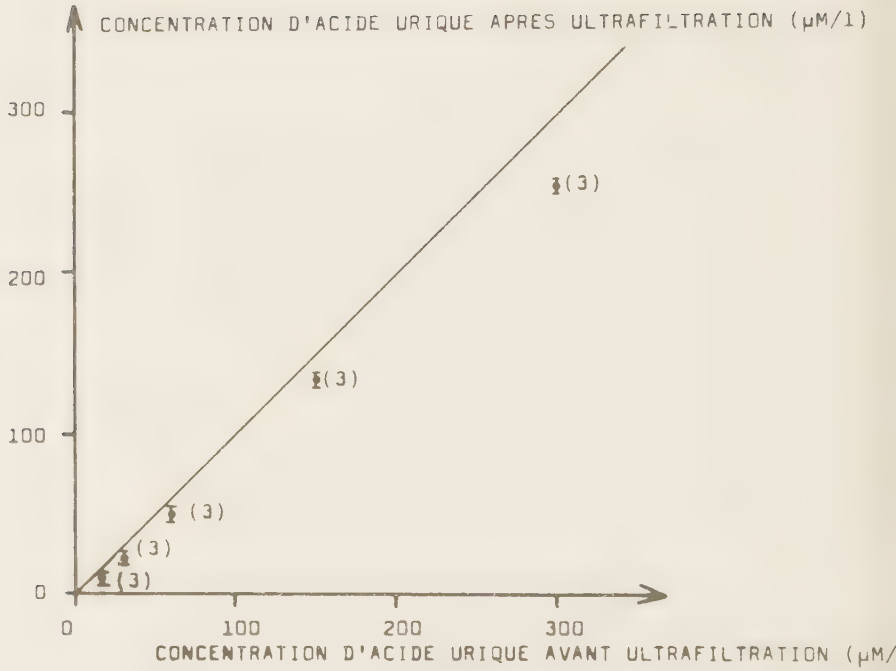


Fig.2.7 : Evaluation de la perte d'acide urique entraînée par l'ultrafiltration.

Les résultats représentent la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne

( ) est le mombre d'expériences

———— est la droite d'identité

Nous avons observé une récupération moyenne de 86,0 ± 1,1 % (n = 15), la perte de 15 % d'acide urique sur la membrane d'ultrafiltration étant indépendante de la concentration d'acide urique présente, à l'intérieur du domaine des concentrations indiquées. Nous avons fait les mêmes expériences avec un autre type de membrane, membrane Diaflo XM-50 (Amicon), qui a adsorbé à peu près 10 % de la quantité d'acide urique filtré.

B. Comparaison des deux méthodes de déprotéinisation

Etant donné la perte d'acide urique sur la membrane d'ultrafiltration, nous avons par la suite déprotéinisé les plasmas par précipitation par l'acide perchlorique, selon la méthode de Poulsen et Praetorius (1954), méthode que nous avons déjà décrite ci-dessus (2.5.1.).

Nous avons comparé la concentration d'acide urique dans des plasmas de rats ayant été surchargés d'acide urique, ces plasmas ayant été déprotéinisés soit par ultrafiltration, soit par précipitation par l'acide perchlorique, les concentrations ont été respectivement 202 ± 54 et 241 ± 66 µM/l (n = 6); la différence a été significative (test de Student sur les différences couplées).

Pour nous assurer que la méthode de précipitation par l'acide perchlorique n'a pas entraîné également une perte d'acide urique, nous avons comparé la concentration d'acide urique dans du plasma déprotéinisé soit par précipita-

tion, soit par ultrafiltration, à la concentration d'acide urique obtenue dans le même plasma non déprotéinisé. Comme un dosage chimique de l'acide urique dans des plasmas non déprotéinisés ne peut être fait avec précision à cause de l'interférence des protéines, nous avons ajouté à 150µl de plasma, 10µl d'acide urique marqué au ^{14}C (acide urique 2-^{14}C, Amersham, Buckinghamshire, England), puis nous avons prélevé une part de ce plasma non déprotéinisé, l'autre part étant ensuite soit déprotéinisée par précipitation, soit déprotéinisée par ultrafiltration. 50µl de plasma non déprotéinisé, ou de plasma déprotéinisé par précipitation, ou de plasma ultrafiltré, ont été ajoutés à 10 ml d'Instagel (Packard) et placés dans un compteur à scintillation (Packard, Liquid Scintillation Spectrometer). Nous avons exprimé les résultats obtenus pour les plasmas soit déprotéinisés par précipitation, soit déprotéinisés par ultrafiltration, en % des cpm obtenus pour les plasmas non déprotéinisés (même "quenching"). Les rapports ont été respectivement 101 $\pm$ 2 et 85 $\pm$ 3% (n = 6). Nous avons ainsi observé aucune perte d'acide urique lorsque les plasmas ont été déprotéinisés par précipitation, mais une perte de 15 % lorsqu'ils ont été ultrafiltrés.

Nous avons encore contrôlé, soit après déprotéinisation par précipitation, soit après ultrafiltration, la récupération de quantités connues d'acide urique (30, 60 et 120 nM, en valeur absolue) ajoutées à des plasmas avant déprotéinisation. Les résultats sont montrés sur la figure 2.8

où nous avons représenté en abcisse les quantités d'acide urique ajoutées au plasma avant déprotéinisation et en ordonnée les quantités d'acide urique retrouvées après déprotéinisation soit par précipitation, soit par ultrafiltration, les quantités d'acide urique retrouvées ont été respectivement 100 % et 80 % des quantités ajoutées.

Nous en avons conclu que la déprotéinisation par précipitation par l'acide perchlorique ne cause pas de perte d'acide urique. Tous les résultats exprimés dans ce travail ont été obtenus avec des plasmas déprotéinisés de cette manière.

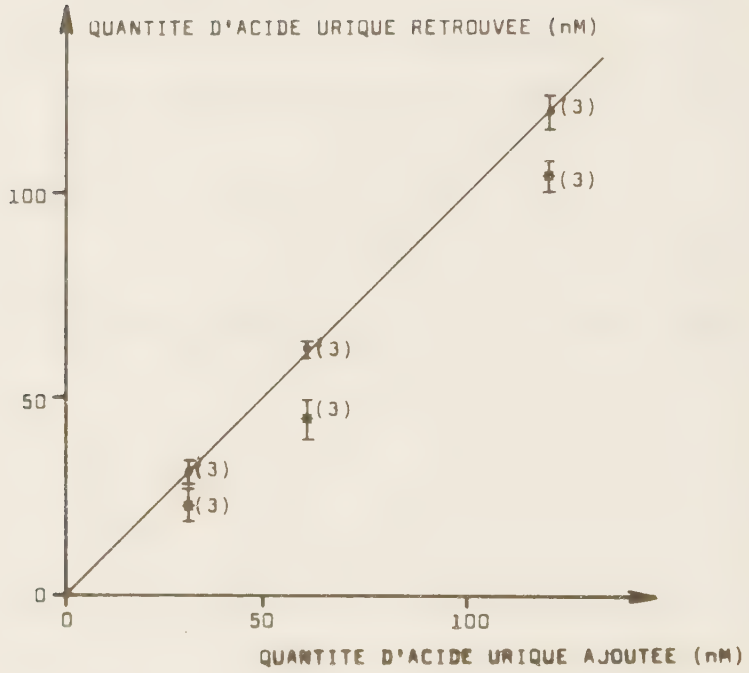


Fig.2.8 : Evaluation de la perte d'acide urique ajouté à des plasmas entraînée par l'ultrafiltration

● plasmas déprotéinisés par précipitation

✸ plasmas déprotéinisés par ultrafiltration

( ) est le nombre d'expériences

——— est la droite d'identité

CHAPITRE 3 : RESULTATS DES EXPERIENCES DE MICROPONCTION EN ECOULEMENT LIBRE

Les expériences de microponction ont été faites dans différents groupes de rats ayant des taux plasmatiques d'acide urique différents grâce à des perfusions variables d'acide urique; comme nous l'avons déjà écrit (2.1.1.), les rats ont été répartis en 6 groupes :

- le groupe de rats A a reçu une perfusion sans acide urique.
- le groupe de rats B a été perfusé à raison de 0,3µM d'acide urique par minute.
- le groupe de rats C a été perfusé à raison de 0,75µM d'acide urique par minute.
- le groupe de rats D a été perfusé à raison de 1,4µM d'acide urique et 0,35µM de carbonate de lithium par minute.
- le groupe de rats E a été perfusé à raison de 0,75µM d'acide urique et 1,3µM d'oxonate de potassium par minute.
- le groupe de rats F a été perfusé à raison de 1,3µM d'oxonate de potassium par minute.

3.1. CALCULS

Pour chaque expérience de microponction, les grandeurs suivantes ont été calculées :

1) La clearance de l'inuline (C inuline), ou filtration glomérulaire, exprimée en ml/minute.Kg de poids corporel, est égale au rapport :

$$\frac{U \text{ inuline} \times V}{P \text{ inuline}}$$

où U inuline = concentration urinaire de l'inuline (mg %)

V = débit urinaire (ml/minute. Kg poids corporel)

P inuline = concentration dans l'eau plasmatique de l'inuline (mg %)

2) La clearance de l'acide urique (C urate), exprimée en ml/minute. Kg de poids corporel, est égale au rapport :

$$\frac{U \text{ urate} \times V}{P \text{ urate}}$$

où U urate = concentration urinaire de l'acide urique (µM/l)

V = débit urinaire (ml/minute. Kg poids corporel)

P urate = concentration dans l'eau plasmatique de l'acide urique (µM/l).

(Nous ne l'avons pas corrigée par le facteur de Donnan).

3) Le rapport C urate/C inuline représente la fraction d'acide urique filtrée excrétée .

4) Le rapport TF/P inuline, respectivement TF/P urate, est égal au rapport des concentrations d'inuline, respectivement d'acide urique, dans le liquide tubulaire (TF) et dans l'eau plasmatique (P).

5) Le rapport TF/P urate : TF/P inuline représente la fraction d'acide urique filtrée non encore réabsorbée au point de ponction. En effet la quantité absolue d'acide urique s'écoulant par minute à travers un tubule au point de ponction (Q urate) est égale à TF urate x $\dot{V}$, ou $\dot{V}$ désigne le débit de liquide tubulaire à ce niveau. La quantité d'acide urique filtrée (F urate) par minute dans le glomérule correspondant est de P urate x SNGFR (= single nephron GFR, filtration glomérulaire par néphron) et SNGFR = TF/P inuline x $\dot{V}$. Par conséquent :

$$\text{Q urate/F urate} = \frac{\text{TF urate} \times \dot{V} \times \text{P inuline}}{\text{P urate} \times \text{TF inuline} \times \dot{V}} = \frac{\text{TF/P urate}}{\text{TF/P inuline}}$$

3.2. RESULTATS

3.2.1. Fonctions rénales globales

A. Remarques

Les mesures de clearance obtenues dans les expé-

riences de microponction pour les groupes de rats A, B, C, D, E et F sont résumées dans le tableau 3.1. Nous avons indiqué dans ce tableau la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne du débit urinaire et de la clearance de l'inuline ou filtration glomérulaire, ces deux valeurs ayant été mesurées pour le rein ponctionné, de la concentration plasmatique d'acide urique, du rapport des concentrations d'acide urique dans l'urine et le plasma et du rapport de la clearance de l'acide urique à celle de l'inuline, ce rapport représentant la fraction d'acide urique filtrée excrétée. Etant donné la bonne corrélation entre la méthode enzymatique et la méthode fluorimétrique pour la détermination de l'acide urique dans les échantillons plasmatiques et urinaires (2.5.4.), seules les valeurs d'acide urique obtenues par la méthode fluorimétrique sont indiquées dans ce tableau. Néanmoins les deux méthodes ont été utilisées pour chaque échantillon. Toutefois, pour le groupe de rats F (perfusé à raison de 1,3µM d'oxonate par minute), seule la méthode fluorimétrique a été utilisée : la présence d'oxonate dans le sang et l'urine de ce groupe de rats n'a pas permis une bonne précision dans la détermination de l'acide urique par la méthode enzymatique, parce que cette méthode est basée sur la chute d'extinction de l'acide urique après addition d'uricase et que l'oxonate est un inhibiteur de l'uricase.

Par contre, dans le groupe de rats C (perfusé à raison de 0,75µM d'acide urique et 1,3µM d'oxonate par minute), la concentration très élevée d'acide urique dans le plasma et l'urine a nécessité, pour le dosage de ces échantillons, une dilution telle que l'oxonate a été trop dilué pour avoir un effet

significatif sur l'uricase : en effet, la récupération de 599 et 898µM/l d'acide urique ajoutées au moment du dosage par du plasma de rat traité par de l'oxonate (même perfusion que dans le groupe de rats F) a été respectivement 587 et 901µM/l (n = 2) par la méthode enzymatique. Ces concentrations très élevées d'acide urique ajoutées au plasma ont nécessité une dilution plasmatique de 80 fois, dilution comparable à celle des plasmas du groupe E.

	DEBIT URINAIRE (ml/kg.minute. 1 rein)	CLEARANCE INULINE (ml/kg.minute. 1 rein)	P_{URATE} (µM/l)	$\frac{U_{URATE}}{P_{URATE}}$	$\frac{C_{URATE}}{C_{INULINE}}$
GROUPE A n=13	0,12 ± 0,01	4,1 ± 0,2	41,9 ± 1,8	11,0 ± 1,3	0,32 ± 0,02
GROUPE B n=16	0,14 ± 0,01	4,5 ± 0,2	82,6 ± 4,2	14,7 ± 1,7	0,42 ± 0,03
GROUPE C n=19	0,13 ± 0,01	3,9 ± 0,3	137,7 ± 6,0	14,7 ± 0,9	0,51 ± 0,03
GROUPE D n=9	0,14 ± 0,01	3,8 ± 0,2	184,5 ± 6,0	19,5 ± 1,4	0,67 ± 0,03
GROUPE E n=8	0,15 ± 0,01	4,2 ± 0,3	201,2 ± 23,8	26,1 ± 2,9	0,92 ± 0,05
GROUPE F n=10	0,16 ± 0,01	4,1 ± 0,3	215,6 ± 12,0	18,8 ± 2,2	0,70 ± 0,02

Tableau 3.1 : Fonctions rénales globales.

Les résultats représentent la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne. n est le nombre de rats.Le débit urinaire et la clearance de l'inuline sont mesurés pour le rein ponctionné.

B. Résultats

Le débit urinaire et la filtration glomérulaire (tableau 3.1) n'ont pas été modifiés par la perfusion d'acide urique : ces deux valeurs ne se sont pas distinguées de manière significative entre les groupes de rats A, B, C, D et E.

Par contre, la fraction d'acide urique filtrée excrétée, représentée par le rapport C urate/C inuline, a augmenté de manière significative avec l'augmentation du taux plasmatique d'acide urique (fig.3.1) : 30 % de l'acide urique filtré ont été excrétés à taux plasmatique physiologique (40µM/l, groupe de rats A perfusé sans acide urique), tandis que 90 % l'ont été au taux plasmatique le plus élevé (600µM/l, groupe de rats E, perfusé à raison de 0,75µM d'acide urique et 1,3µM d'oxonate par minute).

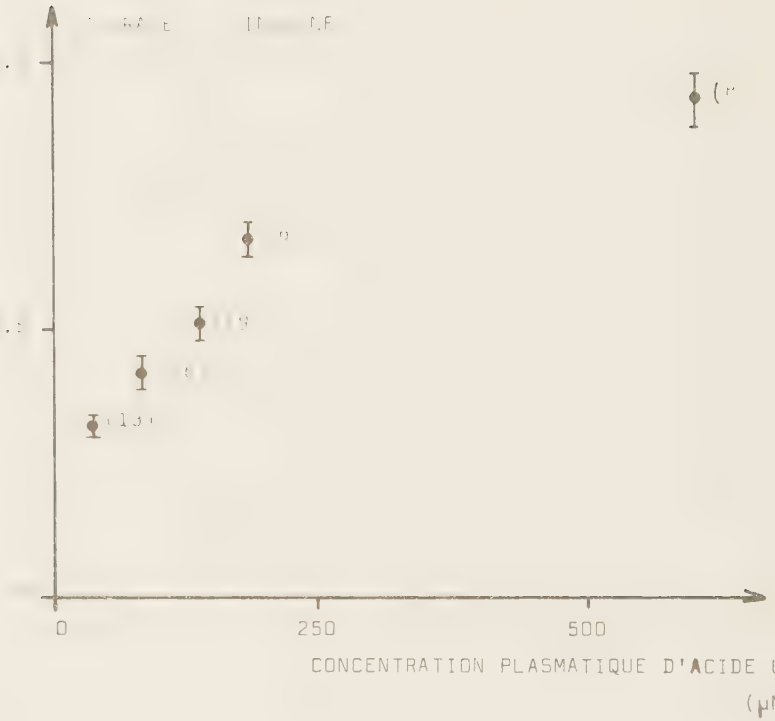


Fig.3.1 : L'excrétion fractionnelle de l'acide urique à différents taux plasmatiques d'acide urique.

Les résultats représentent la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne

( ) est le nombre de rats

Les valeurs de clearance obtenues pour le groupe de rats F (perfusé à raison de 1,3µM d'oxonate par minute) sont également indiquées dans le tableau 3.1. et comparées à celles obtenues dans le groupe de rats D (perfusé à raison de 1,4µM d'acide urique par minute), ces deux groupes de rats ayant eu un taux plasmatique d'acide urique comparable (respectivement 216 ± 12 et 185 ± 6µM/l, ces deux valeurs ne se sont pas distinguées de manière significative). Le débit urinaire, la filtration glomérulaire et la fraction d'acide urique filtrée excétée n'ont pas été significativement différents entre ces deux groupes de rats.

3.4.2. Résultats de microponction

A. Résultats dans les différents groupes de rats A, B, C, D et E

Les figures 3.2; 3.3; 3.4; 3.5 et 3.6 (a et b) représentent les résultats de microponction obtenus dans les groupes de rats A, B, C, D et E.

Nous avons représenté sur l'ordonnée le rapport des concentrations d'acide urique dans le liquide tubulaire et le plasma, TF/P urate (a), ainsi que les fractions non-réabsorbées de l'acide urique filtré au niveau glomérulaire (TF/P urate : TF/P inuline) (b). Comme la localisation tubulaire du site de ponction n'a pas été satisfaisante pour tous les tubules, les rapports TF/P urate et TF/P urate : TF/P inuline sont représentés comme une fonction du rapport TF/P inuline, ce rap-

port pouvant être considéré comme une fonction de la distance à partir du glomérule, comme nous l'avons déjà mentionné (2.2.).

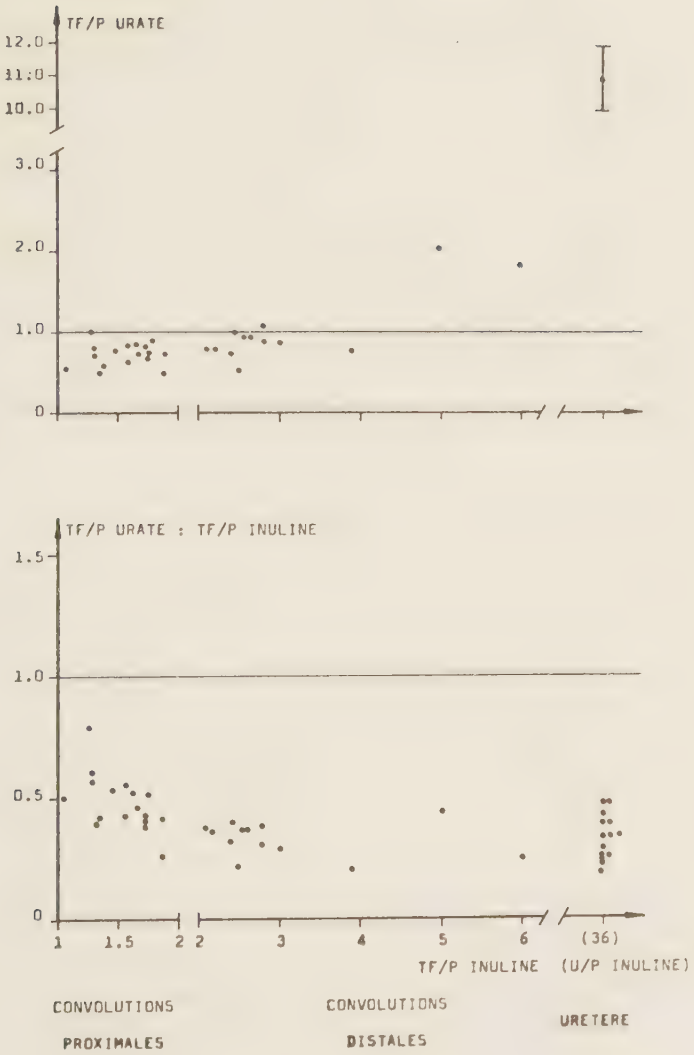


Fig.3.2 : Résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique de 40µM/l (groupe de rats A).

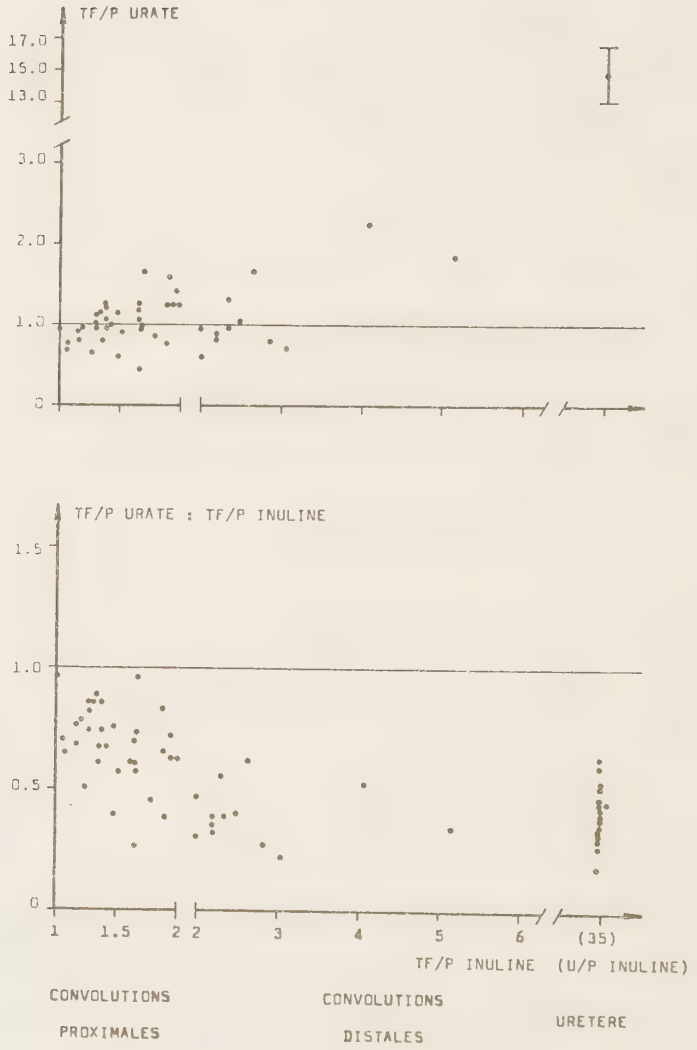


Fig.3.3 : Résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique de 80µM/l (groupe de rats B).

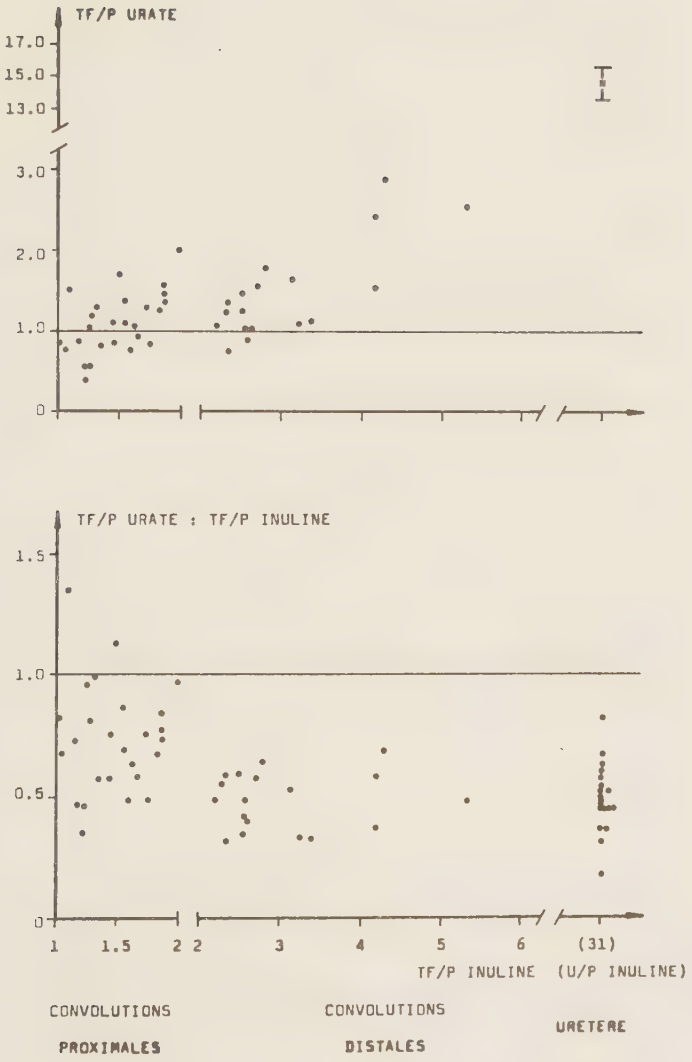


Fig.3.4 : Résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique de 140µM/l (groupe de rats C).

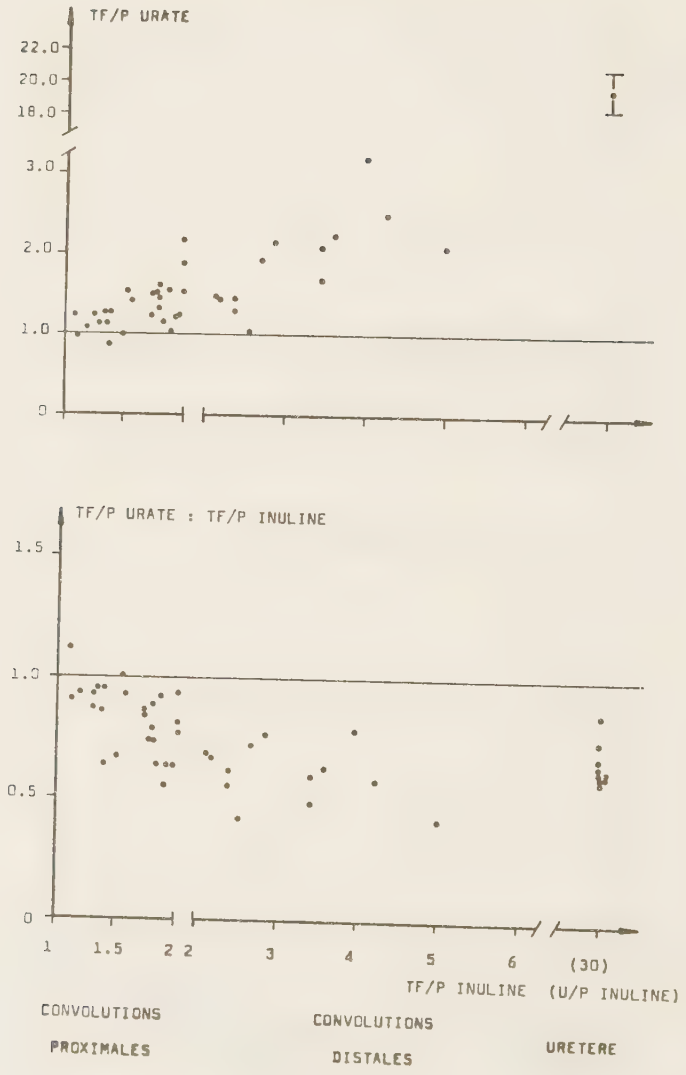


Fig.3.5 : Résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique de 180µM/l (groupe de rats D).

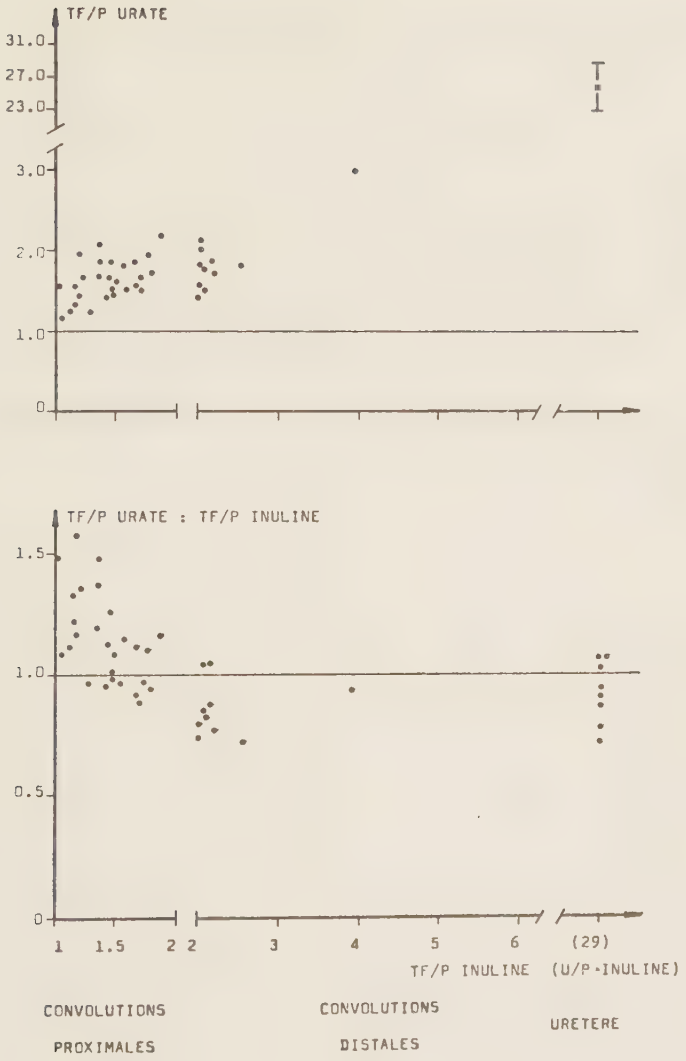


Fig 3.6 : Résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique de 600µM/l (groupe de rats E).

B. Comparaison des groupes de rats A et E

La figure 3.7 (a et b) représente les rapports TF/P urate (a) et TF/P urate : TF/P inuline (b), en fonction du rapport TF/P inuline, chez les rats à taux plasmatique physiologique d'acide urique (groupe de rats A) et les rats au taux plasmatique le plus élevé (groupe de rats E).

Le rapport TF/P urate (a) a été inférieur à 1 au taux plasmatique normal et supérieur à 1 au taux plasmatique le plus élevé, dans les tubules proximaux et distaux accessibles à la microponction.

Dans le tubule proximal accessible, le rapport TF/P urate : TF/P inuline (b) a été inférieur à 1 au taux plasmatique normal. Ce fait indique une réabsorption nette d'acide urique. Par contre, au taux plasmatique le plus élevé, ce rapport a été supérieur à 1 dans la majorité des tubules, indice d'une sécrétion nette d'acide urique. Dans les deux groupes de rats, ce rapport a diminué entre le début et la fin du tubule proximal accessible, n'a pas changé significativement entre la fin du tubule proximal accessible et la première convolution du tubule distal accessible, a été inférieur à 1 dans le tubule distal accessible et n'a pas changé le long du tubule distal.

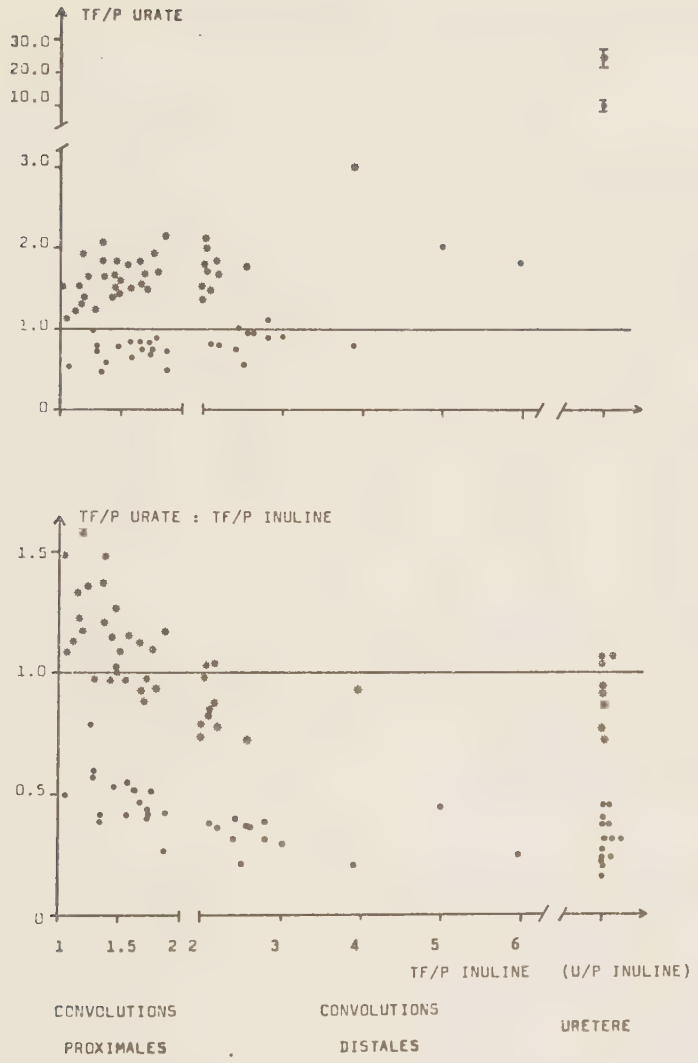


Fig.3.7 : Comparaison des résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique de 40µM/l (groupe de rats A : ●) et dans le groupe de rats au taux plasmatique d'acide urique de 600µM/l (groupe de rats E : ✱).

C. Comparaison des groupes de rats F et D

La figure 3.8 représente les rapports TF/P urate (a) et TF/P urate : TF/P inuline (b), en fonction du rapport TF/P inuline, dans le groupe de rats F (perfusé à raison de 1,uM d'oxonate par minute) et le groupe de rats D (perfusé à raison de 1,4uM d'acide urique par minute).

Dans le tableau 3.2 sont résumées les moyennes ± erreur moyenne de la moyenne des rapports TF/P inuline, TF/P urate et TF/P urate : TF/P inuline, pour les échantillons tubulaires ponctionnés au début et à la fin des tubules proximaux et distaux accessibles et pour les échantillons d'urine pelvienne, dans les deux groupes de rats. Ces valeurs n'ont pas été significativement différentes entre ces deux groupes de rats; cependant le nombre d'observations étant petit, un léger effet de l'oxonate sur l'excrétion rénale de l'acide urique ne peut pas être exclu.

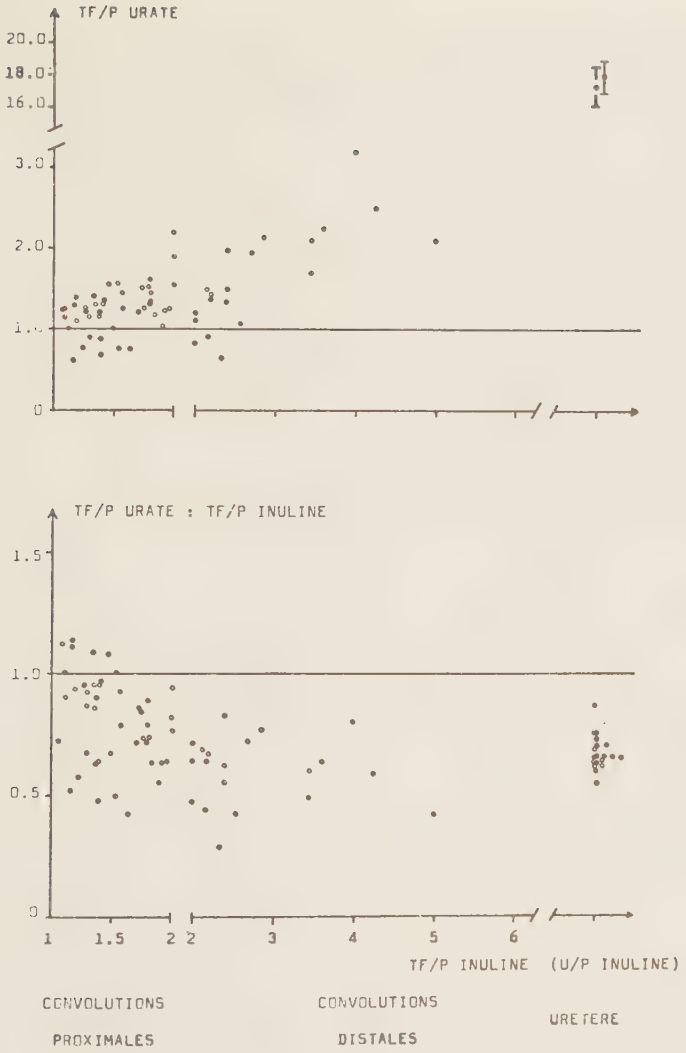


Fig.3.8 : Comparaison des résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats perfusé par de l'oxonate (groupe de rats F : ●) et dans le groupe de rats perfusé par de l'acide urique (groupe de rats D : ○).

	DP	FP	DD	FD	U
GROUPE F					
TF/P INULINE	1,16 ± 0,02	1,73 ± 0,06	2,08 ± 0,13	———	27,0 ± 2,8
TF/P URATE	1,00 ± 0,15	1,17 ± 0,13	1,25 ± 0,11	———	18,8 ± 2,2
TF/P URATE : TF/P INULINE	0,87 ± 0,14 n = 5	0,68 ± 0,07 n = 6	0,60 ± 0,04 n = 4	———	0,70 ± 0,02 n = 10
GROUPE D					
TF/P INULINE	1,25 ± 0,05	1,84 ± 0,08	2,35 ± 0,09	4,20 ± 0,43	29,5 ± 2,2
TF/P URATE	1,11 ± 0,06	1,35 ± 0,18	1,50 ± 0,18	2,52 ± 0,34	19,5 ± 1,4
TF/P URATE : TF/P INULINE	0,90 ± 0,06 n = 6	0,74 ± 0,06 n = 6	0,61 ± 0,06 n = 5	0,62 ± 0,11 n = 4	0,67 ± 0,03 n = 9

Tableau 3.2 : Résumé des résultats de microponction obtenus dans le groupe de rats perfusé par de l'oxonate (groupe de rats F dont le taux plasmatique d'acide urique est de 220 µM/l) et le groupe de rats perfusé par de l'acide urique (groupe de rats D dont le taux plasmatique d'acide urique est de 180µM/l).

Les résultats représentent la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne. n est le nombre d'échantillons. DP = début proximal; FP = fin proximal; DD = début distal; FD = fin distal; U = uretère.

D. Comparaison des groupes de rats ayant des taux plasmatiques d'acide urique différents (A, B, C, D et E)

La figure 3.9 représente la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne des rapports TF/P urate (a) et TF/P urate : TF/P inuline (b), pour les échantillons tubulaires ponctionnés au début et à la fin des tubules proximaux (n varie de 5 à 7) et distaux (n varie de 4 à 6) accessibles et pour les échantillons d'urine pelvienne, dans les groupes de rats aux taux plasmatiques d'acide urique différents : groupes de rats A, B, C, D et E.

Les rapports TF/P urate et TF/P urate : TF/P inuline ont augmenté avec l'augmentation du taux plasmatique de l'acide urique, dans les tubules proximaux et distaux superficiels. Le rapport TF/P urate : TF/P inuline a diminué dans chaque groupe de rats entre le début et la fin des tubules proximaux superficiels. Aucune réabsorption nette significative d'acide urique n'a eu lieu entre la fin du tubule proximal accessible et le début du tubule distal accessible, dans chaque groupe de rats; cependant, lorsque les 5 groupes ont été considérés comme un seul collectif, une réabsorption fractionnelle significative ($P < 0,001$) d'acide urique de 0,16 ± 0,02 a eu lieu dans l'anse de Henle, qui au sens de la microponction comprend en plus la partie droite du tubule proximal. Le rapport TF/P urate : TF/P inuline n'a pas varié de manière significative entre le début et la fin du tubule distal accessible, dans chaque groupe de rats, le groupe E y compris. De même aucune différence significative n'a été observée entre

la fin des convolutions distales accessibles à la microponction et l'urine pelvienne.

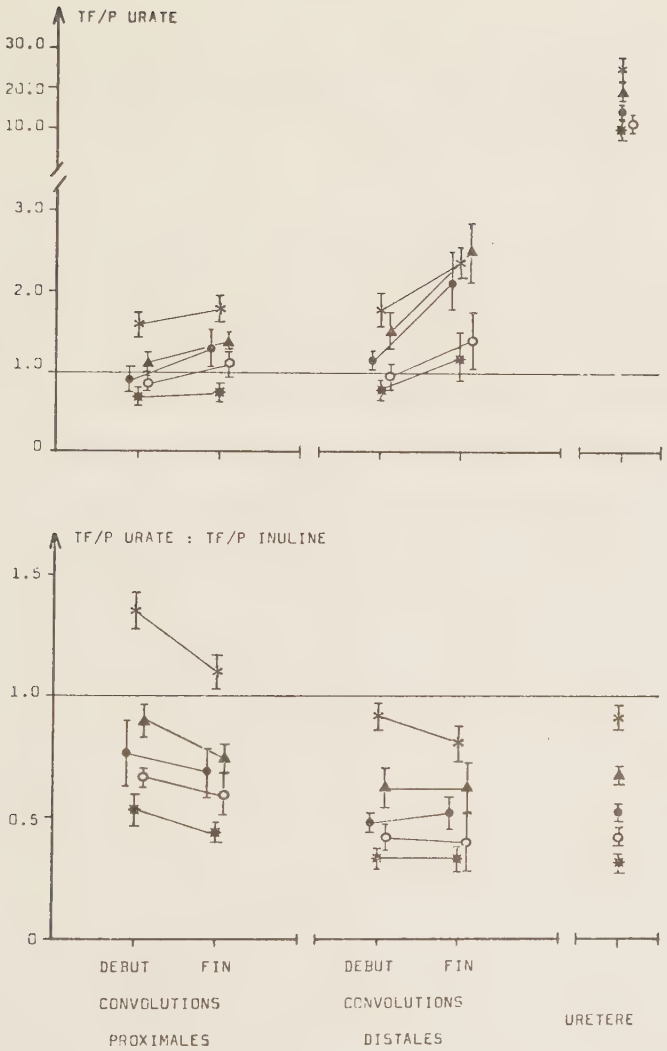


Fig 3.9 : Comparaison des résultats de microponction obtenus dans les groupes de rats aux différents taux plasmatique d'acide urique : groupe A (✱) = 40µM/l; groupe B (O) = 80 µM/l; groupe C (●) = 140µM/l; groupe D (▲) = 180µM/l; groupe E (✱) = 600µM/l.

Les résultats représentent la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne.

3.3. DISCUSSION

3.3.1. Utilisation de l'oxonate

L'utilisation de l'oxonate, inhibiteur de l'uricase tissulaire, pour augmenter le taux plasmatique d'acide urique dans le groupe de rats E paut être mise en question, puisque l'oxonate est un acide organique et se trouve être sécrété par le rein de chien (Yü et coll., 1971); on pourrait supposer que ce composé interfère avec le transport d'acide urique. Toutefois, si tel est le cas, l'interférence est faible; en effet, l'excrétion fractionnelle d'acide urique dans le groupe de rats F (perfusé à raison de 1,3µM d'oxonate par minute) n'a pas été significativement différente de celle du groupe de rats D (perfusé à raison de 1,4µM d'acide urique par minute), ces deux groupes de rats ayant été comparés, parce que leur taux plasmatique d'acide urique a été semblable. L'absence d'effet marqué de l'oxonate sur le transport d'acide urique chez le rat n'est pas surprenant, puisque le rat est très peu sensible aux médicaments influençant le transport d'acide urique chez d'autres espèces (Boudry, 1971b). D'autre part, l'oxonate est un dérivé des diurétiques du groupe des S-triazines et a un faible effet diurétique, toutefois l'administration d'oxonate dans ces expériences n'a pas eu d'influence significative sur l'excrétion d'eau chez les rats. Ces contrôles nous ont permis de considérer le groupe de rats F dans le même collectif que les groupes du type A, B, I et J.

3.3.2. Transport bidirectionnel de l'acide urique

Tubule proximal superficiel

Des expériences de microperfusion chez le rat (Boudry, 1971; Roch-Ramel et coll., 1971; Lang et coll., 1972; Lang et coll., 1973; Roch-Ramel et coll., en préparation) montrent que le mouvement net d'acide urique à travers les parois du tubule proximal superficiel représente la somme d'un flux réabsorptif et d'un flux sécrétoire. Nos expériences de microponction en écoulement libre indiquent qu'au niveau des tubules contournés proximaux, le mécanisme de réabsorption est plus actif que le mécanisme de sécrétion à taux plasmatique physiologique d'acide urique (groupe de rats A : 40µM/l); par contre, lorsqu'une surcharge d'acide urique induit un taux plasmatique de 600µM/l (groupe de rats E), le mouvement de sécrétion prédomine.

Dans quelques expériences préliminaires (de Rougemont et coll., 1973), nous avions démontré une sécrétion nette proximale d'acide urique chez des rats légèrement surchargés en acide urique, ayant un taux plasmatique de 80µM/l. Ces résultats se sont avérés faux par la suite; en effet, dans le groupe de rats B (perfusé à raison de 0,3µM d'acide urique par minute), dont le taux plasmatique est semblable à celui de ces premiers rats, le rapport TF/P urate : TF/P inuline a été inférieur à 1. L'erreur commise a consisté en une sous-estimation de la concentration d'acide urique dans les plasmas, ces der-

niers étant déprotéinisés par ultrafiltration; l'adsorption de l'acide urique sur les filtres, déjà discutée préalablement (chapitre 2), a été responsable d'une surestimation du rapport TF/P urate.

Nos résultats suggèrent que la sécrétion proximale d'acide urique est effectuée par un transport actif, car le rapport des concentrations d'acide urique dans le liquide tubulaire et le plasma, ou TF/P urate, a été considérablement supérieur à 1, dans le groupe de rats où une sécrétion nette au niveau du tubule proximal a été démontrée (groupe de rats E. perfusé à raison de 0,75µM d'acide urique et 1,3µM d'oxonate par minute); en effet, la sécrétion d'acide urique à partir des capillaires péritubulaires s'est faite contre un gradient de concentration, la concentration tubulaire ayant été supérieure à la concentration plasmatique.

Le rapport TF/P urate inférieur à 1 dans le groupe de rats au taux plasmatique physiologique d'acide urique (groupe A), a indiqué que la réabsorption d'acide urique a été également effectuée contre un gradient chimique et a donc été par définition active; si nous supposons une différence de potentiel transépithélial de -1mV au début du tubule proximal (Barrat et coll., 1974), l'équation de Nernst (Davson, 1970) permet de calculer un rapport TF/P urate de 0,96 à l'équilibre électrochimique; notre rapport TF/P urate de 0,68 indique par conséquent un mécanisme actif de la réabsorption. A la fin du tubule proximal, la réabsorption paraît être aussi active, la différence de potentiel transépithélial étant positive (Barrat et coll., 1974).

La diminution du rapport TF/P urate : TF/P inuline entre le début et la fin des convolutions proximales accessibles, dans chaque groupe de rats, indique une réabsorption nette d'acide urique entre ces deux point. Dans les groupes d'animaux à TF/P urate : TF/P inuline ≥ 1, cette chute indique une diminution progressive de la prédominance de la sécrétion sur la réabsorption le long du tubule contourné proximal.

Anse de Henle

L'anse de Henle, telle qu'elle peut être étudiée par microponctions des néphrons superficiels, comprend en plus la partie droite du tubule proximal.

Nos résultats indiquent qu'une faible réabsorption d'acide urique a eu lieu entre la fin des convolutions proximales et le début des convolutions distales accessibles, quel qu' ait été le taux plasmatique d'acide urique. Toutefois la réabsorption de faibles quantités d'acide urique n'a été significative que lorsque les cinq groupes de rats ont été considérés ensemble.

Une faible réabsorption d'acide urique dans l'anse de Henle a également été démontrée dans des expériences de microinjection (Kramp et coll., 1971), ainsi que dans des expériences de microperfusion (Roch-Ramel et coll., en préparation).

Tubule distal superficiel

Nous n'avons observé aucun mouvement net d'acide urique dans le tubule distal accessible, ce qui est en accord avec les résultats de Oelert et coll., (1969); ce groupe a montré par la technique de microperfusion stationnaire que le coefficient de perméabilité pour l'acide urique n'est pas significativement différent de zéro dans le tubule distal.

L'acide urique ne paraît pas être réabsorbé entre la fin des convolutions distales des néphrons superficiels et le bassinet rénal. En effet, le rapport TF/P urate : TF/P inuline observé à la fin des convolutions distales accessibles n'a pas différé de manière significative du rapport U/P urate : U/P inuline mesuré dans l'urine pelvienne, quel qu'ait été le taux plasmatique d'acide urique. Cependant des mouvements d'acide urique à travers la paroi des tubes collecteurs ne sont pas exclus : la contribution des néphrons juxtamédullaires à l'urine collectée au bassinet rénal étant inconnue, nous ne pouvons pas conclure à l'absence de mouvements d'acide urique à travers les parois des tubes collecteurs. Si de tels mécanismes existent, leur importance paraît être faible; en effet, Kramp et coll., (1971) a montré par la technique de microinjections une réabsorption de 3 % lorsque l'acide urique a été injecté dans les convolutions distales.

Notre étude permet de conclure que le rat répond à une perfusion d'acide urique par une augmentation de l'excré-

tion fractionnelle d'acide urique (C urate/C inuline). Ce comportement est semblable à celui de l'homme (Berliner et coll., 1950; Gutman et coll., 1959; Yü et coll., 1962; Steele et coll., 1967), du chimpanzé (Fanelli et coll., 1971), du singe Cebus (Fanelli et coll., 1970c) et du chien (Friedman et coll., 1948b; Yü et coll., 1960; Lathem et coll., 1960; Mudge et coll., 1968a). Chez ces différentes espèces, et le rat ne fait pas exception, une sécrétion nette d'acide urique dans l'urine finale n'est pas toujours démontrée après surcharge d'acide urique. D'autres espèces au contraire sont capables d'établir un rapport C urate/C inuline supérieur à 1 après augmentation du taux plasmatique d'acide urique; c'est le cas du lapin (Poulsen et coll., 1954; Møller, 1966; Sneikh et coll., 1971), du cobaye (Mudge et coll., 1968b) et du chien dalmate (Friedman et coll., 1948b; Kessler et coll., 1959; Yü et coll., 1960). Toutefois, il n'a pas été clairement établi si, chez les mammifères sécrétant l'acide urique à taux plasmatique physiologique, une augmentation de la concentration plasmatique d'acide urique induit une augmentation de l'excrétion fractionnelle ou au contraire une diminution, comme chez le poulet (Shannon, 1938; Berger et coll., 1960), indiquant une saturation progressive du mécanisme sécrétoire.

L'augmentation de l'excrétion fractionnelle à la suite d'une augmentation de la concentration plasmatique, chez le rat, paraît être due à une augmentation du transport sécrétoire et non à une saturation du transport dans le sens de la réabsorption : les expériences de microperfusion de Roch-Ramel et

coll., (en préparation) montrent une très grande capacité de transport de ce mécanisme; dans ces études une augmentation de la concentration d'acide urique dans la solution de perfusion de 83 à 830µM/l n'a pas saturé le mécanisme de réab-

[illegible]

.4.1. Comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par d'autres groupes

Nos résultats diffèrent considérablement de ceux de deux études de microponction en écoulement libre, l'une publiée par Greger et Lang (1971; 1974a), l'autre par Abramson et coll., (1973), les résultats de ces deux études étant également à leur tour contradictoires. Comme Roch-Ramel l'a déjà discuté, la cause de ces divergences doit être recherchée avant tout dans les différentes méthodes analytiques utilisées.

Greger et coll.,(1971) ont démontré une sécrétion nette d'acide urique dans le tubule proximal superficiel de rats non surchargés en acide urique, c'est-à-dire à taux plasmatique physiologique. Par contre le rapport TF/P urate : TF/P inuline moyen qu'ils ont obtenu dans le tubule distal (Greger et coll., 1974a) a été comparable à celui que nous avons rapporté ici. Ils concluent qu'une forte réabsorption d'acide urique a lieu dans l'anse de Henle, réabsorption démontrable également dans leurs études de microperfusion (Greger et coll., 1974a).

Dans leurs expériences la concentration d'acide urique dans les échantillons plasmatiques et d'urine pelvienne

a été mesurée par une méthode enzymatique spécifique; cependant, pour les échantillons d'urine tubulaire, ils ont adapté une méthode colorimétrique décrite par Folin en 1912 et basée sur la réduction d'un complexe de l'acide phosphotungstique par l'acide urique; cette méthode, jugée non spécifique par Yü et coll., (1957b), surestime la concentration d'acide urique dans l'urine pelvienne (Roch-Ramel et coll., en préparation) qui contient des substances réductrices autres que l'acide urique et pourrait par conséquent aussi surévaluer la concentration d'acide urique dans le liquide tubulaire. La "sécrétion" d'acide urique qu'ils ont observée dans le tubule proximal pourrait donc provenir d'une surestimation du rapport TF/P urate. La même critique s'applique aux expériences de microperfusion tubulaire du même groupe (Lang et coll., 1972; Lang et coll., 1973); en effet, en mesurant le flux de réabsorption par la disparition d'acide urique radioactif (acide urique -2^{14}C) du liquide de perfusion, ils ont trouvé un flux semblable à celui observé par Roch-Ramel et coll., (en préparation). En revanche, lorsqu'ils ont mesuré le flux de sécrétion par l'entrée d'acide urique non marqué dans le perfusat en dosant l'acide urique dans le liquide tubulaire à l'aide de leur méthode chimique, ils l'ont trouvé nettement supérieur à celui observé par Roch-Ramel et coll., (en préparation) utilisant la méthode fluorimétrique décrite ici.

La méthode analytique n'est peut-être pas la seule cause de la divergence de résultats : la souche de rats que le groupe de Greger et Lang a utilisé n'a pas été la même que la nôtre.

Or Boudry (1971a) a montré que l'excrétion fractionnelle de l'acide urique peut varier d'une souche de rats à l'autre; bien que Greger et Lang (1971) aient dosé l'acide urique plasmatique par une méthode enzymatique spécifique, le taux plasmatique physiologique trouvé a été nettement supérieur à celui trouvé par nous et d'autres groupes de chercheurs (Friedman et coll., 1948; Boudry, 1971a; Steele et coll., 1974).

D'autres auteurs, Abramson et coll., (1973) ont évité la difficulté de la mesure de la concentration d'acide urique dans le liquide tubulaire par les méthodes chimiques, en développant une microtechnique de chromatographie sur colonne; cette dernière permet de séparer l'allantoïne marquée de l'acide urique marqué, l'allantoïne résultant de l'oxydation in vivo de l'acide urique 2-^{14}C, dans les échantillons plasmatiques urinaires et tubulaires (Abramson et coll., 1974). Utilisant cette technique analytique, Abramson et coll., (1973) ont observé une réabsorption nette d'acide urique dans les parties initiales du tubule contourné proximal, le rapport TF/P urate : TF/P inuline étant comparable à celui que nous avons obtenu (environ 0,7). En revanche, ils ont observé une sécrétion nette d'acide urique dans les parties terminales des convolutions proximales, le rapport TF/P urate : TF/P inuline augmentant entre le début et la fin du tubule proximal; toutefois, le rapport TF/P urate : TF/P inuline est resté inférieur à 1 à la fin du tubule proximal.

L'excrétion fractionnelle de l'acide urique (C urate/C/ inuline = 0,9) dans leurs expériences a été beaucoup plus élevée que celle observée dans d'autres groupes (C urate/C inu-

line = 0,2 à 0,4) (Friedman et coll., 1948a; Boudry, 1971a; Steele et coll., 1974). Cette divergence de résultats suggère que la méthode de séparation quantitative par chromatographie n'est pas satisfaisante.

En conclusion, il semble que les différences de résultats soient dues à des différences de méthodes utilisées pour déterminer la concentration d'acide urique. Aussi bien Greger et Lang que Abramson et coll., ont utilisés des méthodes insuffisemment contrôlées.

3.3.4. Remarques

Il est important de remarquer que les conclusions que nous tirons de notre étude du transport rénal d'acide urique chez le rat n'est valable que si le rein de rat ne produit pas de grandes quantités d'acide urique qui seraient ajoutées au liquide tubulaire par un transport non pas transcellulaire mais de la cellule dans la lumière tubulaire et si l'acide urique sécrété à la membrane péritubulaire n'est pas détruit par la présence d'uricase intracellulaire.

La capacité du rein de rat de synthétiser l'acide urique est démontrée dans un certain nombre d'études (Etudes in vitro : Bernheim et coll., 1974; Westerfeld et coll., 1949; Richert et coll., 1951; Friedman et coll., 1953; Alexander et coll., 1966; Roch-Ramel et coll., 1973a. Etude in vivo : Roch-Ramel et coll., 1974) : la synthèse d'acide urique dans les

cellules rénales, puis sa diffusion dans la lumière tubulaire pourrait ainsi induire une surestimation du transport sécrétoire. Ce facteur paraît être toutefois négligeable, puisque selon Lang et coll. (1973), la quantité d'acide urique sécrétée excède la production d'acide urique de l'organisme entier d'un facteur 5.

La capacité du rein de dégrader l'acide urique est plus controversée; certaines études mettent en évidence la présence d'uricase dans les cellules rénales (Truszkowsky et coll., 1933; Roch-Ramel et coll., 1973a; Roch-Ramel et coll., 1974; Bowman et Roch-Ramel, non publié) et notamment l'étude histochimique de Graham et coll. (1965) démontre la présence d'uricase dans les cellules proximales et distales, ainsi que dans les cellules des tubes collecteurs. D'autres auteurs, par contre, n'observent aucune activité uricasique dans le tissu rénal de rat (Etudes in vitro : Bernheim et coll., 1947; Strauss, 1956; Thoenes et coll., 1969). La dégradation de l'acide urique dans les cellules rénales pourrait ainsi induire une augmentation du gradient de concentration d'acide urique entre le liquide tubulaire et la cellule rénale. Toutefois l'activité uricasique est très faible et paraît ne pas jouer de rôle (Lang et coll., 1974).

3.4. CONCLUSION

Les résultats présents indiquent que chez le rat, les transports d'acide urique s'effectuent essentiellement au ni-

veau du tubule proximal, la réabsorption tubulaire étant prédominante à taux plasmatique d'acide urique physiologique et la sécrétion tubulaire plus importante à un taux plasmatique environ 15 fois plus élevé. Ces résultats confirment par une méthode directe que le tubule proximal est le siège de la sécrétion et le siège essentiel de la réabsorption d'acide urique. Bien que le rat n'excrète que 20 à 40 % de la charge d'acide urique filtrée, il doit y avoir un processus de sécrétion qui est masqué par la réabsorption et ceci est similaire à ce qu'on observe chez le chien où seule une méthode de stop-flow modifiée, utilisant l'acide urique marqué au ^{14}C a permis de montrer un mouvement de sécrétion.

Notre étude permet en outre de dire que la sécrétion et la réabsorption d'acide urique peuvent se faire contre un gradient et par conséquent nous pouvons suggérer que ces deux mécanismes de transport sont des processus actifs.

L'existence de ces deux mécanismes de transport opposés est un non-sens biologique, d'autant plus que ces deux mécanismes paraissent avoir lieu simultanément dans le même segment du néphron.

CHAPITRE 4 : RESULTATS DES EXPERIENCES DE CLEARANCE CHEZ DES RATS ANESTHESIES ET CHEZ DES RATS NON-ANESTHESIES

Ces expériences ont eu pour but celui d'étudier l'effet de l'anesthésie sur l'excrétion rénale de l'acide urique. Comme nous l'avons déjà décrit (2.1.2.), les rats ont été répartis en 5 groupes :

- groupe de rats 1 : rats non-anesthésiés puis anesthésiés au pentobarbital sodique.
- groupe de rats 2 : rats non-anesthésiés pendant toute l'expérience.
- groupe de rats 3 : rats anesthésiés à l'éther puis au pentobarbital sodique.
- groupe de rats 4 : rats non-anesthésiés puis anesthésiés au pentobarbital sodique.
- groupe de rats 5 : rats non-anesthésiés.

4.1. RESULTATS

A. Comparaison des mesures de clearance chez les rats anesthésiés et chez les rats non-anesthésiés

Les mesures de clearance des 5 groupes de rats sont résumées dans le tableau 4.1. Dans ce tableau, nous avons re-

présenté la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne des deux mesures de clearance de la première période ainsi que la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne des deux mesures de clearance de la deuxième période.

	DEBIT URINAIRE (ml/kg.minute, 2 reins	CLEARANCE INULINE (ml/kg.minute. 2 reins	P_{URATE} (µM/l)	$\frac{U_{URATE}}{P_{URATE}}$	$\frac{C_{URATE}}{C_{INULINE}}$
GROUPE 1 (n=8)					
Eveil (V)	0,33 ± 0,08	13,9 ± 1,1	131,7 ± 24,0	[illegible] ± 2,5	[illegible] ± [illegible]
Anesthésie (A)	0,22 ± 0,03	9,9 ± 1,4	59,9 ± 6,0	25,2 ± 3,4	0,56 ± 0,05
GROUPE 2 (n=7)					
Eveil (V)	0,26 ± 0,02	10,3 ± 1,8	131,7 ± 6,4	9,6 ± 1,4	[illegible] ± [illegible]
Eveil (V)	0,24 ± 0,01	9,6 ± 0,7	107,8 ± 4,3	12,1 ± 1,2	0,36 ± 0,05
GROUPE 3 (n=5)					
Anesthésie-éther (A)	0,21 ± 0,03	7,5 ± 0,8	65,9 ± 6,0	19,8 ± 2,4	0,55 ± 0,03
Anesthésie-Nembutal (A)	0,27 ± 0,03	7,5 ± 1,0	59,9 ± 12,5	16,3 ± 1,8	0,53 ± 0,04
GROUPE 4 (n=6)					
Eveil (A)	0,41 ± 0,05	13,5 ± 1,0	53,9 ± 3,0	25,4 ± 3,5	0,64 ± 0,04
Anesthésie (A)	0,42 ± 0,06	11,1 ± 1,0	51,5 ± 2,4	16,4 ± 2,5	0,59 ± 0,06
GROUPE 5 (n=5)					
Eveil (V)	0,12 ± 0,03	[illegible] ± [illegible]	101,8 ± 12,0	21,3 ± 3,2	0,34 ± 0,05
Eveil (A)		6,7 ± 1,5	71,9 ± 12,0	30,2 ± 5,1	0,53 ± 0,08

Tableau 4.1 : Fonctions rénales globales chez des rats anesthésiés et chez des rats non-anesthésiés.

Les résultats représentent la moyenne ± l'erreur moyenne de la moyenne, n est le nombre de rats. A = sang artériel. V = sang veineux.

Dans aucun des groupes de rats, le débit urinaire ou la filtration glomérulaire n'ont été modifiés entre la première et la deuxième période de clearance.

Dans le groupe de rats 1 (période d'éveil avec prise de sang à la veine saphène, puis période sous anesthésie au pentobarbital sodique avec prélèvement de sang à la carotide), l'excrétion fractionnelle d'acide urique (C urate/C inuline) a été significativement plus élevée et le taux plasmatique d'acide urique plus bas dans la période sous anesthésie au pentobarbital sodique que pendant la période sans anesthésie. Cette augmentation de l'excrétion fractionnelle et cette baisse de la concentration plasmatique d'acide urique n'ont pas été expliquées par une simple modification au cours du temps. En effet, les résultats obtenus dans le groupe de rats 2 (deux périodes d'éveil avec prélèvement de sang à la veine saphène) ont montré que l'excrétion fractionnelle et le taux plasmatique de l'acide urique ont été identiques au cours de ces deux périodes.

Le pentobarbital, acide organique, pourrait interférer directement avec les mécanismes de transport de l'acide urique. Pour prouver que le pentobarbital sodique n'a pas été directement responsable de l'augmentation de l'excrétion fractionnelle de l'acide urique et de la baisse du taux plasmatique d'acide urique, les rats du groupe 3 ont été anesthésiés par de l'éther dans la première période puis par du pentobarbital sodique pendant la deuxième période (prélèvements de sang à la carotide). On n'a observé aucune différence dans l'excré-

tion fractionnelle et dans le taux plasmatique de l'acide urique entre ces deux types de narcose.

Si le pentobarbital sodique n'a pas été responsable de la différence d'excrétion fractionnelle de l'acide urique, entre la première et la deuxième période du groupe de rats 1, il reste la possibilité que la différence ait été due à une erreur commise dans l'évaluation de la concentration plasmatique de l'acide urique due aux différentes méthodes utilisées pour prélever du sang; en effet, les échantillons de sang ont été pris à la veine saphène dans le cas des rats non-anesthésiés et à la carotide dans le cas des rats anesthésiés. Dans le groupe de rats 4, nous avons prélevé le sang à la carotide aux rats non-anesthésiés et anesthésiés au pentobarbital sodique. Dans ce cas, aucune différence dans l'excrétion fractionnelle ou le taux plasmatique d'acide urique n'a été observée entre ces deux périodes.

Le sang prélevé à la veine saphène a toujours été légèrement hémolysé, cette hémolyse pourrait être responsable de l'effet observé soit dans le groupe de rats 1 entre la période sans anesthésie pendant laquelle le sang a été prélevé à la veine saphène et la période sous anesthésie pendant laquelle le sang a été prélevé à la carotide, soit dans le groupe de rats 5, dans lequel le sang a été prélevé sous éveil simultanément à la carotide et à la veine saphène; dans ce dernier groupe de rats, une différence dans l'excrétion fractionnelle et le taux plasmatique d'acide urique a été significative suivant que les échantillons de sang ont été pris à la carotide ou à la veine saphène. Le rôle de l'hémolyse est étu-

dié sous B.

B. Effet de l'hémolyse sur la concentration plasmatique de l'acide urique

Dans le but d'évaluer le rôle éventuel de l'hémolyse dans l'augmentation de la concentration plasmatique de l'acide urique, nous avons effectué l'expérience in vitro suivante : l'hémolyse a été produite dans du sang par adjonction d'eau distillée dans un rapport de 1 à 10; la concentration plasmatique de l'acide urique a été déterminée dans ce sang hémolysé et comparée à la concentration plasmatique mesurée dans le même sang traité avec du NaCl isotonique, dans le rapport 1 à 10.

La concentration plasmatique d'acide urique, mesurée par la méthode enzymatique, a été 32 $\pm$ 3 dans le sang hémolysé et 20 $\pm$ 2µM/l ($n = 5$) dans le sang non hémolysé; ces deux moyennes ont été significativement différentes (test de Student sur les différences couplées).

4.4. DISCUSSION

La différence entre l'excrétion fractionnelle de l'acide urique observée par Boudry (1971a) chez des rats non-anesthésiés et par nous dans les expériences de microponction est confirmée dans le groupe de rats 1 (tableau 4.2.) : le rapport clearance urate/clearance inuline a été significativement plus élevé dans la période sous anesthésie, les prises de sang ayant

été faites dans cette période par incision des veines saphènes.

Nos résultats indiquent que la différence dans l'excrétion fractionnelle de l'acide urique entre les rats anesthésiés et les rats non-anesthésiés n'a pas été due à l'utilisation du pentobarbital sodique mais au fait que chez les rats non-anesthésiés, le sang a été pris par incision de la veine saphène et a toujours été hémolysé. Les résultats observés in vitro ont confirmé que le sang hémolysé a une concentration d'acide urique plus élevée que le sang non-hémolysé : les surestimations de la concentration plasmatique de l'acide urique a entraîné ainsi une sous-estimation du rapport U/P urate et par conséquent une sous-estimation de l'excrétion fractionnelle de l'acide urique.

Apparemment les globules rouges contiennent une concentration d'acide urique plus élevée que le plasma. Les travaux de Greger et coll., (1974b) confirment cette hypothèse. Dans des expériences in vitro chez le rat, ils montrent un captage considérable de l'acide urique par les globules rouges, ce transport dépend de la température et du pH. Les études de Overgaard-Hansen et coll. (1959), ainsi que de Lassen (1961), ont montré l'existance d'un mécanisme de transport de l'acide urique dans les érythrocytes humains.

Des études plus complètes sont nécessaires pour définir la nature du transport de l'acide urique dans les érythrocytes.

En conclusion, les divergences observées entre les résultats de Boudry et les nôtres sont dues à une erreur de

technique de prélèvement de sang. Boudry a systématiquement sous-estimé l'excrétion fractionnelle de l'acide urique en surestimant la concentration plasmatique.

CHAPITRE 5 : RESUME DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

Les expériences présentées ici ont montré que l'excrétion fractionnelle de l'acide urique chez le rat a augmenté quand le taux plasmatique d'acide urique a augmenté; elle a été de 0,3, à taux plasmatique physiologique (40µM/l), et est devenue 0,9 au taux plasmatique le plus élevé (600µM/l), sans toutefois atteindre une moyenne supérieure à 1 qui signifierait une sécrétion nette de l'acide urique. Cependant, la technique de microponctions en écoulement libre a permis de mettre en évidence, dans le tubule proximal accessible, une sécrétion nette d'acide urique au taux plasmatique le plus élevé, tandis qu'une réabsorption nette a été observée à taux plasmatique physiologique. Quel que soit le taux plasmatique de l'acide urique nous avons observé une faible réabsorption entre la fin des convolutions proximales et le début des convolutions distales accessibles; par contre, aucun transport net d'acide urique n'a été mis en évidence dans le tubule distal accessible, quelle que soit la charge filtrée.

Les expériences de microperfusion tubulaire de Roch-Ramel et coll. (en préparation) permettent de conclure que cette augmentation de l'excrétion fractionnelle de l'acide urique lorsque la charge filtrée a été augmentée, est le résultat d'une augmentation du transport sécrétoire et non une saturation du transport réabsorptif, la capacité de ce système de transport étant très grande.

Nos résultats confirment l'hypothèse de Yü et Gutman (1961) selon laquelle l'excrétion de l'acide urique par le rein de mammifères est la résultante de trois processus : la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire. L'importance relative des mécanismes de réabsorption et de sécrétion dépend chez le rat, comme chez d'autres mammifères, des conditions expérimentales; en effet, nous avons observé que lorsque le taux plasmatique d'acide urique est bas, le mécanisme de réabsorption est plus efficace et masque celui de sécrétion; par contre, lorsque le taux plasmatique est 15 à 20 fois plus élevé que la concentration physiologique, le mécanisme de sécrétion domine.

Nous avons montré par la méthode très précise des microponctions en écoulement libre que le tubule proximal contourné est le siège essentiel des transports de l'acide urique chez le rat; ainsi le rat se comporte comme le serpent, le chien, le poulet, le cobaye et le lapin; chez toutes ces espèces, la réabsorption ou la sécrétion de l'acide urique ont été localisées presqu'exclusivement dans ce segment du néphron, par la technique de stop-flow, technique beaucoup moins précise que celle de microponctions.

Nos résultats suggèrent en outre que les mécanismes de réabsorption et de sécrétion tubulaires s'effectuent par un transport actif; en effet, lorsque la réabsorption est démontrable (taux plasmatique physiologique de l'acide urique) ou lorsque la sécrétion est démontrable (taux plasmatique de l'acide urique le plus élevé), ces deux mécanismes s'effectuent

contre un gradient électrochimique, ce qui n'a pu être démontré jusqu'à maintenant par l'utilisation des techniques de microperfusion ou de microinjection tubulaires.

Par cette étude, nous avons précisé la physiologie de l'excrétion rénale de l'acide urique chez le rat; l'existence des deux mécanismes de réabsorption et de sécrétion tubulaires permet de mieux comprendre l'"effet paradoxal" des substances inhibitrices du transport rénal de l'acide urique chez l'homme ou chez le singe, qui à faible concentration inhibent la sécrétion tubulaire et à concentration élevée inhibent la réabsorption tubulaire, ainsi que l'action différente d'un certain inhibiteur suivant l'espèce animale; le probénécide, par exemple, inhibe la sécrétion tubulaire chez les espèces dont l'excrétion est caractérisée par une sécrétion prédominante et inhibe la réabsorption tubulaire chez les espèces dont l'excrétion est caractérisée par une réabsorption prédominante. Une étape suivante pour une meilleure compréhension de l'excrétion rénale de l'acide urique chez le rat, sera l'étude des causes de la résistance de cette espèce aux inhibiteurs du transport rénal de l'acide urique.

B I B L I O G R A P H I E

ABRAMSON R.G.,LEVITT M.F. : Micropuncture study of uric acid transport in rat kidney.Abstract. 6 th meeting,American Soc.Nephrol.Nov. 19-20,p.1 (1973).

ABRAMSON R.G.,LEVITT M.F.,MAESAKA J.K.,KATZ J.H. : A simple radioisotopic technique for the study of urate transport in the rat kidney.J.Appl.Physiol.36,500-505 (1974).

ADLERSBERG D.,GRISHMAN E.,SOBOTKA H. : Uric acid partition in gout and in hepatic disease.Arch.Int.Med.70,101-120 (1942).

ALVSAKER J.O. : Uric acid in human plasma.III Investigations on the interaction between the urate ion and human albumin.Scand.J. Clin.Lab.Invest.17,467-475 (1965).

BARRATT L.J.,RECTOR F.C.,KOKKO J.P.,SELDIN D.W. : Factors governing the transepithelia potential difference across the proximal tubule of the rat kidney.J.Clin.Invest.53,454-464 (1974).

BEECHWOOD E.C.,BERNDT W.O.,MUDGE G.H., : Stop-flow analysis of tubular transport of uric acid in rabbits.Am.J.Physiol.207,1265-1272 (1964).

BENE E.,KERSLEY G.D.,: Ultrafiltration of plasma uric acid.J.Clin. Path.4,366-369 (1951).

BERGER L.,YU T.F. : Urinary excretion of uric acid after instantaneous intrarenal-arterial injection in mongrel and Dalmatian dogs.Mount Sinaï J.Med.,37,351-358 (1970).

BERGER L.,YU T.F.,GUTMAN A.B. : Effect of drugs that alter uric acid excretion in man on uric acid clearance in the chicken.Am. J.Physiol.,198,575-580 (1960).

BERLINER R.W.,HILTON J.G.,YU T.F.,KENNEDY T.J. : The renal mechanism for urate excretion in man.J.Clin.Invest.29,396-401 (1950).

BERNDT W.O.,: The efflux of urate from rabbit renal cortex slices.J.Pharmacol.Exp.Ther.150,414-419 (1965).

BERNHEIM F.,BERNHEIM M.L. : The purine metabolism of rat liver and kidney slices in vitro.Arch.Biochem.,12,249-255 (1947).

BLANCHARD K.C.,MAROSKE D.G.,MAY D.G.,WEINER I.M. : Uricosuric potency of 2-substituted analogs of probenecid.J.Pharmacol.Exp.

[illegible],331-[illegible] (1972).

BLOCH P.L.,LATA G.F. : Fluorescence assay for picomole quantities of uric acid : a new enzyme-coupled approach.Anal.Biochem.38,1-[illegible].

BLUESTONE R.,KIPPEN I.,KLINENBERG J.,WHITEHOUSE M. : Effect of some uricosuric and anti-inflammatory drugs on the binding of uric acid to human serum albumin in vitro.J.Lab.Clin.Med.76,85-91 (1970).

BONJOUR J.P. : débit urinaire et filtration glomérulaire chez le rat normal et surrénalectomisé.Helv.physiol.pharmacol.Acta 24,24-44 (1966).

BORDLEY J.,RICHARDS A.N. : Quantitative studies of the composition of glomerular urine.The concentration of uric acid in glomerular urine of snakes and frogs,determined by an ultramicroadaptation of Folin's method.J.Biol.Chem.101,193-221 (1933).

BOUDRY J.F. : Mécanismes de l'excrétion rénale de l'acide urique chez le rat.Pflügers Arch.328,265-278 (1971a).

BOUDRY J.F. : Effet d'inhibiteurs des transports transtubulaires sur l'excrétion rénale d'acide urique chez le rat.Pflügers Arch. [illegible],279-[illegible] (1971b).

BOUDRY J.F.,ROCH-RAMEL F. : Untersuchung der transtubulären Harnsäurebewegungen mittels kontinuierlicher Mikroperfusion bei der Ratte.VII Symposion der Gesellschaft für Nephrologie.Tübingen.Stuttgart,New-York,F.K.Schattauer,175-178 (1970).

BOURKE E.,LEDINGHAM J.G.,STOKES G.S. : Effects of intravenous ethacrynic acid on the renal handling of citrate and urate in man.Clin. Sci.31,231-240 (1966).

BR[illegible]M.,YU T.F.,BERGER L.,SCHVART N.,TAROSDAG S.,FLEISCHER L., FERTIG H.,SCHWARTZ M.S.,QUAN R.B. : Hyperuricemia induced by chlorthalidone and other sulfonamide diuretics.Am.J.Med.33,408-[illegible] (1962).

BURG M.,GRANTHAM J.,ABRAMOW M.,ORLOFF J. : Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons.Am.J.Physiol.210,1293-[illegible].

BURNS J.J.,YU T.F.,BERGER L.,GUTMAN A.B. : Zoxazolamine.Physiological disposition,uricosuric properties.Am.J.Med.25,401-408 (1958).

CAMPION D.,BLUESTONE R.,KLINENBERG J.R. : Uric acid : characterization of its interaction with human serum albumin.J.Clin.Invest.52,2383-2387 (1973).

CANNON P.J.,HEINEMANN H.O.,STASON W.B.,LARAGH J.H. : Ethacrynic acid;effectiveness and mode of diuretic action in man.Circulation 31,5-18 (1965).

CARTIER P.,HAMET M. : Le métabolisme normal de l'acide urique.In : Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker,7-31 (1973).

COOMBS F.S.,PECORA L.J.,THOROGOOD E.,CONSOLAZIO W.V.,TALBOTT J.H.: Renal function in patients with gout.J.Clin.Invest.19,525-535 (1940).

CROSS R.J.,TAGGART J.V. : Renal tubular transport :accumulation of p-aminohippurate by rabbit kidney slices.Am.J.Physiol.161,181-190 (1950).

DANTZLER W.H. : Effect of metabolic alkalosis and acidosis on tubular urate secretion in water snakes.Am.J.Physiol.215,747-751 (1968).

DANTZLER W.H. : Effects of K,Na and ouabain on urate and PAH uptake by snake and chicken kidney slices.Am.J.Physiol.217,1510-1519 (1969).

DANTZLER W.H. : Comparison of renal tubular transport of urate and PAH in water-snakes : Evidence for differences in mechanisms and sites of transport.Comp.Biochem.Physiol.34,609-623 (1970).

DANTZLER W.H. : Characteristics of urate transport by isolated perfused snake proximal renal tubules.Am.J.Physiol.224,445-453 (1973).

DANTZLER W.H. : PAH transport by snake proximal renal tubules : differences from urate transport.Am.J.Physiol.226,634-641 (1974).

DANTZLER W.H.,SCHMIDT-NIELSEN B. : Stop-flow study of renal function in conscious water-snakes (Natrix Sipedon).Comp.Biochem.Physiol.22,131-140 (1967).

DAVIS B.B.,FIELD J.B.,RODNAN G.P.,KEDES L.H. : Localization and Pyrazinamide inhibition of distal transtubular movement of uric acid-$2^{14}C$ with a modified stop-flow technique.J.Clin.Invest.44, 716-721 (1965).

DAVSON H. : Textbook of general physiology.Chap.10,p.585 (Williams and Wilkins,1970).

DEMARTINI F.E.,WHEATON E.A.,HEALEY L.A.,LARAGH J.H. : Effect of

chlorothiazide on the renal excretion of uric acid.Am.J.Med.32, 5[illegible] 19[illegible]).

DESPOPOULOS A. : Renal excretory transport of organic acids : inhibition by oxypurines.Am.J.Physiol.197,1107-1110 (1959).

ELION G.B. : Traitement médicamenteux de l'hyperuricémie.In : Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker,51-57 (1973).

FANELLI G.M.,BEYER K. : Uric acid in nonhuman primates with special reference to its renal transport.Ann.Rev.Pharmacol.14,355-364 (1974).

FANELLI G.M.,BOHN D.L.,REILLY S.S. : Renal effects of uricosuric agents in the Cebus monkey.J.Pharmacol.Exp.Ther.175,259-266 (1970a).

FANELLI G.M.,BOHN D.L.,REILLY S.S. : Renal urate transport in the Chimpanzee.Am.J.Physiol.220,613-620 (1971).

FANELLI G.M.,BOHN D.L.,REILLY S.S.,BAER J.E. : Renal excretion and uricosuric properties of halofenate,a hypolipidemic-uricosuric agent,in the Chimpanzee.J.Pharmacol.Exp.Ther.180,377-396 (1972).

FANELLI G.M.,BOHN D.L.,REILLY S.S.,WEINER I.M. : Effects of mercurial diuretics on renal transport of urate in the Chimpanzee. Am.J.Physiol.224,985-992 (1973a).

FANELLI G.M.,BOHN D.L.,RUSSO H.F. : Renal clearance of uric acid in nonhuman primates.Comp.Biochem.Physiol.33,459-464 (1970b).

FANELLI G.M.,BOHN D.L.,STAFFORD S. : Functional characteristics of renal urate transport in the Cebus monkey.Am.J.Physiol.218, 627-636 (1970c).

FANELLI G.M.,WEINER I.M. : Pyrazinoate excretion in the Chimpanzee.Relation to urate disposition and the actions of uricosuric drugs.J.Clin.Invest.52,1946-1957 (1973b).

FARRELL P.C. : Protein-binding of urate ions in vitro and in vivo.In EDWARDS : Drugs and the Kidney.Progr.biochem.Pharmacol.9, 153-162 (Karger,Basel 1974).

FARRELL P.C.,POPOVICH R.P.,BABB A.L. : Binding levels of urate ions in human serum albumin and plasma.Biochim.Biophys.Acta 243, [illegible]).

FRIEDMAN M. : Observations concerning the effects of 1)sodium salicylate and 2)sodium salicylate and glycine upon the production and excretion of uric acid and allantoin in the rat.Am. J.Physiol.152,302-308 (1948a).

FRIEDMAN M.,BYERS S.O. : Observations concerning the causes of

the excess excretion of uric acid in the Dalmatian dog.J.Biol. Chem.175,727-735 (1948b).

FRIEDMAN M.,BYERS S.O. : Distribution of uric acid in rat tissues and its production in tissue homogenates.Am.J.Physiol.172,29-32 (1953).

GOTTSCHALK C.W.,MOREL F.,MYLLE M. : Tracer microinjection studies of renal tubular permeability.Am.J.Physiol.209,173-178 (1965).

GRAHAM R.C.,KARNOVSKY M.J. : The histochemical demonstration of uricase activity.J.Histochem.Cytochem.13,448-453 (1965).

GREGER R.,LANG F.,DEETJEN P. : Handling of uric acid by the rat kidney.I Microanalysis of uric acid in proximal tubular fluid. Pflügers Arch.324,279-287 (1971).

GREGER R.,LANG F.,DEETJEN P. : Urate handling by the rat kidney.VI Reabsorption in the loops of Henle.Pflügers Arch. 352,115-120 (1974a).

GREGER R.,LANG F.,PULS F.,DEETJEN P. : Urate interaction with plasma proteins and erythrocytes.Possible mechanism for urate reabsorption in kidney medulla.Pflügers Arch.352,121-133 (1974b).

GUTMAN A.B. : Uricosuric drugs,with special reference to probenecid and sulfinpyrazone.Adv.Pharmacol.4,91-142 (1966).

GUTMAN A.B.,YU T.F. : Renal function in gout.Am.J.Med.23,600-622 (1957).

GUTMAN A.B.,YU T.F. : A three-component system for regulation of renal excretion of uric acid in man.Trans.Ass.Am.Physicians 74, 353-364 (1961).

GUTMAN A.B.,YU T.F. : Renal mechanisms for regulation of uric acid excretion,with special reference to normal and gouty man.Sem. Arthr.Rheum.2,1-46 (1972).

GUTMAN A.B.,YU T.F.,BERGER L. : Tubular secretion of urate in man. J.Clin.Invest.38,1778-1781 (1959).

GUTMAN A.B.,YU T.F.,BERGER L. : Renal function in gout.III Estimation of tubular secretion and reabsorption of uric acid by use of PZA.Am.J.Med.47,575-592 (1969).

HARPER H.A. : Review of physiological chemistry.Chap.16,p.373-387 (Lange Medical Publications,1969).

HEALEY L.A.,MAGID G.H.,DECKER J.L. : Uric acid retention due to hydrochlorothiazide.New Engl.J.Med.261,1358-1362 (1959).

HEALEY L.A.,MAGID E.,REGAN T. : Uricosuric effect of chlorprothixene.New Engl.J.Med.272,526-527 (1965).

JOHNSON W.J.,STAVRIC B.,CHARTRAND A. : Uricase inhibition in the rat by S-triazines : an animal model for hyperuricemia and hyperuricosuria.Proc.Soc.Exp.Biol.Med.131,8-12 (1969).

KEILIN J. : The biological significance of uric acid and guanine excretion.Biol.Rev.Cambridge Phil.Soc.34,265-296 (1959).

KESSLER R.H.,HIERHOLZER K.,GURD R.S. : Localization of urate transport in the nephron of mongrel and Dalmatien dog kidney. Am.J.Physiol.197,601-603 (1959).

KLINENBERG J.R.,BLUESTONE R.,CAMPION D.,WHITEHOUSE M. : The binding of urate to plasma proteins.Adv.Exp.Med.Biol.41b,557-566 (1973).

KRAMP R.A.,LASSITER W.E.,GOTTSCHALK C.W. : Urate-2^{14}C transport in the rat nephron.J.Clin.Invest.50,35-48 (1971).

LANG F.,GREGER R.,DEETJEN P. : Handling of uric acid by the rat kidney.II Microperfusion studies on bidirectional transport of uric acid in the proximal tubule.Pflügers Arch.335,257-265 (1972).

LANG F.,GREGER R.,DEETJEN P. : Handling of uric acid by the rat kidney.III Microperfusion studies on steady state concentration of uric acid in the proximal tubule.Consideration of free-flow conditions.Pflügers Arch.338,295-302 (1973).

LANG F.,GREGER R.,DEETJEN P. : In vivo studies on uricase activity in the rat.Pflügers Arch.351,323-330 (1974).

LASSEN U.V. Kinetics of uric acid transport in human erythrocytes. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 53,557-569 (1961).

LATHEM W.,DAVIS B.B.,RODNAN G.P. : Renal tubular secretion of uric acid in the mongrel dog.Am.J.Physiol.199,9-12 (1960).

LEMIEUX G.,GOUGOUX A.,VINAY P.,MICHAUD G. : Uricosuric effect of benziodarone in man and laboratory animals : a comparative study.Am.J.Physiol.224,1431-1439 (1973).

MALVIN R.L.,WILDE W.S.,SULLIVAN L.P. : Localization of nephron transport by stop-flow analysis.Am.J.Physiol.194,135-141 (1958).

MAY D.G.,WEINER I.M. : The renal mechanisms for the excretion of m-hydroxybenzoic acid in Cebus monkeys : relationship to urate transport.J.Pharmacol.Exp.Ther.176,407-417 (1971).

MØLLER J.V. : The effects of D- and L-lactate and osmotic diuretics

on uric acid clearance in the rabbit.Acta physiol.scand.54,30-36 (1962).

MØLLER J.V. : Clearance experiments on the effects of probenecid on urate excretion in the rabbit.Acta pharmacol.(Kbh) 23,321-328 (1965a).

MØLLER J.V. : The tubular site of urate transport in the rabbit kidney and the effect of probenecid on urate secretion. Acta pharmacol.(Kbh) 23,329-336 (1965b).

MØLLER J.V. : The excretion of urate at various plasma concentrations and during osmotic diuresis in the rabbit.Acta physiol. scand.66,419-426 (1966).

MØLLER J.V. : The relation between secretion of urate and PAH in the rabbit kidney.J.Physiol.192,505-517 (1967).

MUDGE G.,BERNDT W.,VALTIN H. : Uric acid.In : Handbook of physiology.Sect.8 : Renal physiology.Section eds : J.Orloff,R.W.Berliner.Washington,American Physiological Society,p.619-634 (1973).

MUDGE G.,CUCCHI J.,PLATTS M.,BERNDT W. : Renal excretion of uric acid in the dog.Am.J.Physiol.215,404-410 (1968a).

MUDGE G.,MC ALARY B.,BERNDT W. : Renal transport of uric acid in the guinea pig.Am.J.Physiol.214,875-879 (1968b).

NECHAY B.R.,NECHAY L. : Effects of probenecid,sodium salicylate, 2,4-dinitrophenol and pyrazinamide on renal secretion of uric acid in chickens.J.Pharmacol.Exp.Ther.126,291-295 (1959).

OELERT H.,BAUMANN K.,GEKLE D. : Permeabilitätsmessungen einiger schwacher organischer Säuren aus dem distalen Konvolut der Rattenniere.Pflügers Arch.307,178-189 (1969).

OVERGAARD-HANSEN K.,LASSEN U.V. : Active transport of uric acid through the human erythrocyte membrane.Nature 184,553-554 (1959).

PITTS R.F. : Physiologie du rein et du milieu intérieur.Chap.1, p.1-8 (Masson et Cie,Paris,1970).

PLATTS M.M.,MUDGE G. : Accumulation of uric acid by slices of kidney cortex.Am.J.Physiol.200,387-391 (1961).

POULSEN H. : Inhibition of uric acid excretion in rabbits given probenecid or salicylic acid.Acta pharmacol.(Kbh) 11,277-286 (1955).

POULSEN H.,PRAETORIUS E. : Tubular excretion of uric acid in rabbits.Acta pharmacol.(Kbh) 10,371-378 (1954).

PRAETORIUS E.,POULSEN H. : Enzymatic determination of uric acid with detailed directions.Scand.J.Clin.Lab.Invest.5,273-280 (1953).

RICHARDS A.,WALKER A. : Methods of collecting fluid from known regions of the renal tubules of amphibia and of perfusing the lumen of a single tubule.Am.J.Physiol.118,111-120 (1937).

RICHERT D.A.,WESTERFELD W.W. : Xanthine oxidases in different species.Proc.Soc.Exp.Biol.Med.76,252-254 (1951).

[illegible],COTTET [illegible],AMIEL C.,[illegible]-ROBERT C.,PODEVIN R. : Traitement de l'hyperuricémie des goutteux et des insuffisants rénaux par la benziodarone.Extrait de la Presse Médicale 24,1247-1249 (1966).

RICKEWAERT A.,KUNTZ D. : Variétés étiologiques de l'hyperuricémie et de la goutte.Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker, [illegible]-[illegible] (1972).

ROCH-RAMEL F.,BOUDRY J.F. : Tubular fate of $2^{14}C$ urate : microperfusion experiments.Abstract.Fed.Proc.30,819 (1971).

ROCH-RAMEL F.,CHOMETY-DIEZI F.,de ROUGEMONT D.,TELLIER M.,WIDMER J.,PETERS G. : Mechanisms of the renal excretion of uric acid in the rat.A micropuncture and microperfusion study.En préparation.

ROCH-RAMEL F.,TELLIER M.,PETERS G. : Synthesis and degradation of uric acid in rat renal cortical tissue.Abstract.Experientia 29, [illegible] (1973a).

ROCH-RAMEL F.,TELLIER M.,PETERS G. : The role of the kidney in uric acid excretion. Abstract.Kidney Int.5,312 (1974).

ROCH-RAMEL F.,WEINER I.M. : Excretion of urate by the kidneys of Cebus monkeys.A micropuncture study.Am.J.Physiol.224,1369-1374 [illegible].

ROUFFIGNAC C. de,MOREL F. : Etude par microdissection de la distribution et de la longueur des tubules proximaux dans le rein de cinq espèces de rongeurs.Arch.Anat.Micr.Morph.Exp.56,123-132 (1967).

ROUGEMONT D. de,ROCH-RAMEL F.,: Free-flow micropuncture study of renal uric acid excretion in the rat.Abstract.Experientia 29-[illegible],[illegible] (1973).

RUNDLES R.W.,WYNGAARDEN J.B.,HITCHINGS G.H.,ELION G.B. : Drugs and uric acid.Ann.Rev.Pharmacol.9,345-362 (1969).

SEEGMILLER J.E.,: The acute attack of gouty arthritis.Arth.Rheum.

8,714-723 (1965).

SEEGMILLER J.E.,GRAYZEL A.I.,HOWELL R.R.,PLATO C. : The renal excretion of uric acid in gout.J.Clin.Invest.41,1094-1098 (1962).

SHANNON J.A. : The excretion of uric acid by the chicken.J.Cellular Comp.Physiol.11,135-148 (1938).

SHEIKH M.I.,MØLLER J.V. : Binding of urate to proteins of human and rabbit plasma.Biochim.Biophys.Acta 158,456-458 (1968).

SHEIKH M.I.,MØLLER J.V. : The mechanism of urate transport in rabbit kidney tubules in vitro.Pflügers Arch.325,235-246 (1971).

SIMKIN P.A. : Uric acid binding to serum proteins : differences among species.Proc.Soc.Exp.Biol.Med.139,604-606 (1972).

SKEITH M.D.,HEALEY L.A. : Urate clearance in Cebus monkeys.Am. J.Physiol.214,582-584 (1968).

SONNENBERG H.,OELERT H.,BAUMANN K. : Proximal tubular reabsorption of some organic acids in the rat kidney in vivo.Pflügers Arch.286,171-180 (1965).

STEELE T.H.,OPPENHEIMER S. : Factors affecting urate excretion following diuretic administration in man.Am.J.Med.47,564-574 (1969).

STEELE T.H.,RIESELBACH R.E. : The renal mechanism for urate homeostasis in normal man.Am.J.Med.43,868-875 (1967).

STEELE T.H.,UNDERWOOD J.L.,DUDGEON K.L. : Urate excretion and urine flow in a lithium induced diabetes insipidus rat model.Pflügers Arch.346,205-213 (1974).

STRAUS W. : Concentration of acid phosphatase,ribonuclease,desoxyribonuclease,β-glucuronidase and cathepsin in "droplets" isolated from the kidney cells of normal rats.J.Biophys.Biochem.Cytol.2,513-521 (1956).

THOENES W.,LANGER K.H. : Relationship between cell structure of renal tubules and transports mechanisms.In : Renal transport and diuretics.K.Thurau and H.Jahrmärker.Eds.Springer,Berlin-Heidelberg-New York : 37-69 (1969).

TRUSZKOWSKI R.,GOLDMANOWNA C. : Uricase and its action.VI Distribution in various animals.Biochem.J.27,612-614 (1933).

VINAY P.,GOUGOUX A.,MICHAUD G.,LEMIEUX G. : Benziodarone,a stimulator of urate secretion in man and Cebus monkey.Clin.Res.20, 614 (1972).

VUREK G.G.,PEGRAM S.E. : Fluorimetric method for the determination of nanogram quantities of inulin.Anal.Biochem.16,409-419 (1966).

WEINER I.M.,TINKER J.P. : Pharmacology of pyrazinamide : metabolic and renal function studies related to the mechanism of drug-induced urate retention.J.Pharmacol.Exp.Ther.180,411-434 (1972).

WESTERFELD W.W.,RICHERT D.A. : The xanthine oxidase activity of rat tissues.Proc.Soc.Exp.Biol.Med.71,181-184 (1949).

WINDHAGER E.E. : Micropuncture techniques and nephron function. Butterworth and Co.LTD (1968).

WOLFSON W.Q.,COHN C.,SHORE C. : The renal mechanism for urate excretion in the Dalmatian coach-hound.J.Exp.Med.92,121-128 (1950).

WOLFSON W.Q.,HUDDLESTUN B.,LEVINE R. : The transport and excretion of uric acid in man.II The endogenous uric acid-like chromogen of biological fluids.J.Clin.Invest.26,995-1001 (1947).

YU T.F.,BERGER L.,KUPFER S.,GUTMAN A.B. : Tubular secretion of urate in the dog.Am.J.Physiol.199,1199-1204 (1960).

YU T.F.,BERGER L.,GUTMAN A.B. : Suppression of tubular secretion of urate by pyrazinamide in the dog.Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.)107, 905-908 (1961).

YU T.F.,BERGER L.,GUTMAN A.B. : Renal function in gout.II Effect of uric acid loading on renal excretion of uric acid.Am.J.Med.33, 829-844 (1962).

YU T.F.,BERGER L.,STONE D.J.,WOLF J.,GUTMAN A.B. : Effect of pyrazinamide and pyrazinoic acid on urate clearance and other discrete renal functions.Proc.Soc.Exp.Biol.Med.96,264-267 (1957a).

YU T.F.,GUTMAN A.B. : Ultrafiltrability of plasma urate in man. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.84,21-24 (1953).

YU T.F.,GUTMAN A.B. : Paradoxical retention of uric acid by uricosuric drugs in low dosage.Proc.Soc.Exp.Biol.Med.90,542-547 (1955).

YU T.F.,GUTMAN A.B. : Quantitative analysis of uric acid in blood and urine.Methods and interpretation.Bull.Rheum.Dis.7 (Suppl,), 17-20 (1957b).

YU T.F.,GUTMAN A.B. : Study of the paradoxical effects of salicylate in low,intermediate and high dosage on the renal mechanisms for excretion of urate in man.J.Clin.Invest.38,1298-1315 (1959).

YU T.F.,GUTMAN A.B.,BERGER L.,KAUNG C. : Low uricase activity in the Dalmatian dog simulated in mongrels given oxonic acid.Am.J. Physiol.220,973-979 (1971).

ZINS G.R.,WEINER I.M. : Bidirectional urate transport limited to proximal tubule in dogs.Am.J.Physiol.215,411-422 (1968).